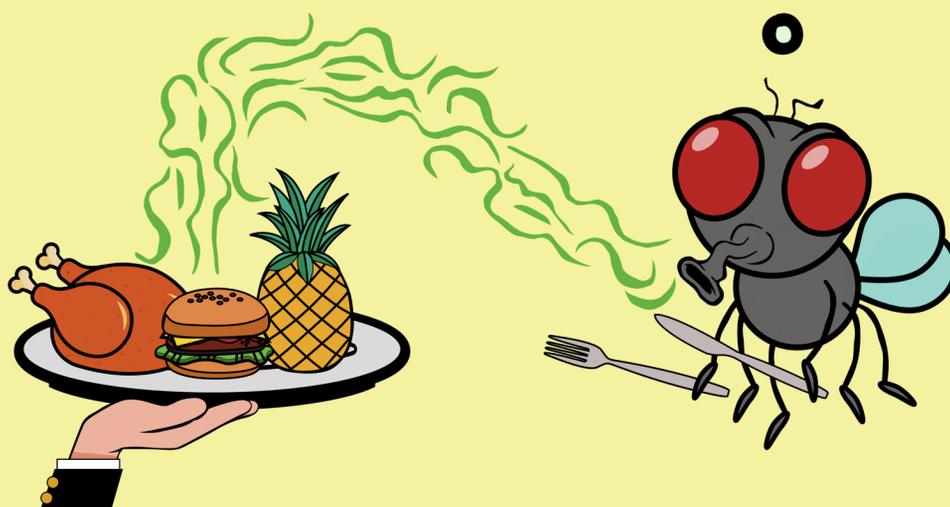
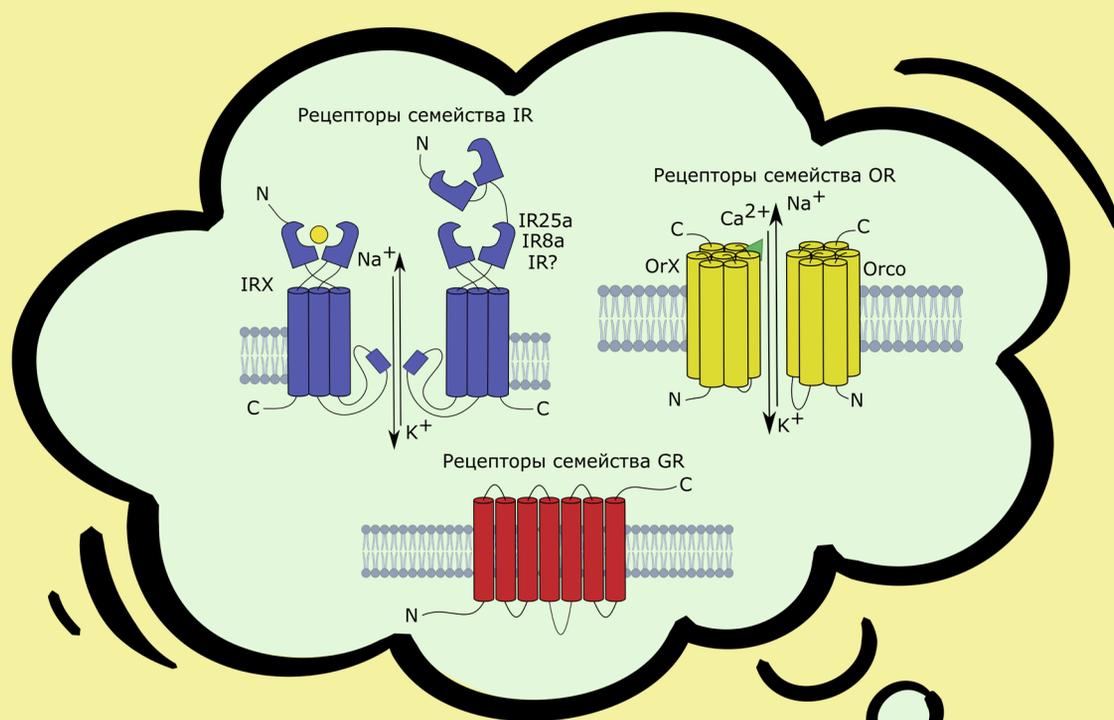


ActaNaturae

Молекулярные основы хеморецепции насекомых



НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ КАК ФАКТОР
ЦИТОТОКСИЧНОСТИ
РИБОНУКЛЕАЗ
СТР. 24

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ РАСТЕНИЙ:
ЭТИОЛОГИЯ, СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ,
ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЗАЩИТЫ
РАСТЕНИЙ
СТР. 46



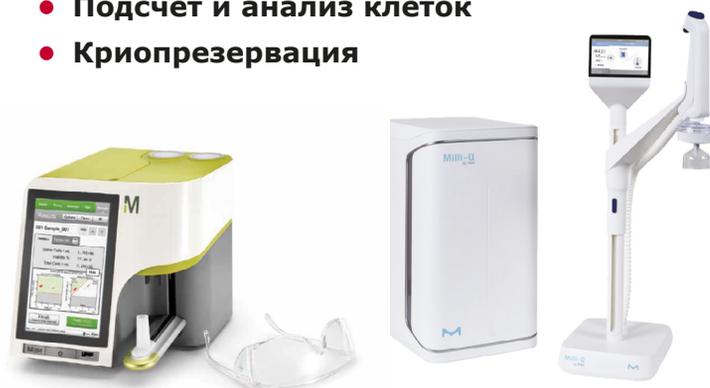
КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА



- Клеточные линии и первичные клетки
- Среды классические и специальные
- Стерилизующая фильтрация



- Биохимические реагенты
- Системы очистки воды
- Подсчет и анализ клеток
- Криопрезервация



Широкий выбор и высочайшее качество клеточных линий нашего партнера – Европейской коллекции клеточных культур (ECACC):

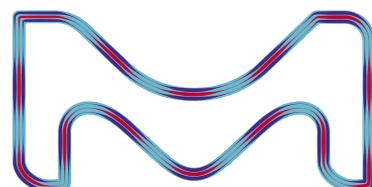
- 4000 клеточных линий животных и человека;
- Клетки 45 видов животных и 50 типов тканей;
- 370 эталонных В-лимфобластных клеточных линий с данными о типе лейкоцитарного антигена человека (HLA);
- 480 гибридомных клеточных линий, секретирующих моноклональные антитела;
- ДНК, РНК, кДНК, экстрагированные из клеточных линий коллекции;

SIGMAaldrich.com/ECACC

ООО «Мерк»

115054, г. Москва, ул. Валовая, д. 35, Тел.: +7 (495) 937-33-04
E-mail: mm.russia@merckgroup.com, ruorder@sial.com

SIGMAaldrich.com/cellculture
MERCKmillipore.com/cellculture

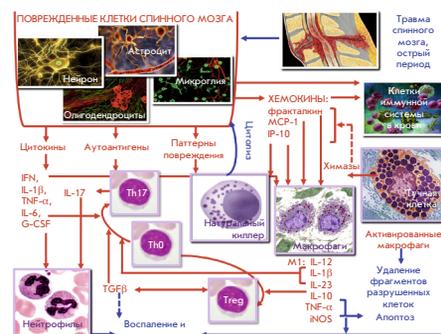


SIGMA-ALDRICH[®] is now MERCK

Цитокиновый профиль как маркер клеточного повреждения и иммунной дисфункции при травмах спинного мозга

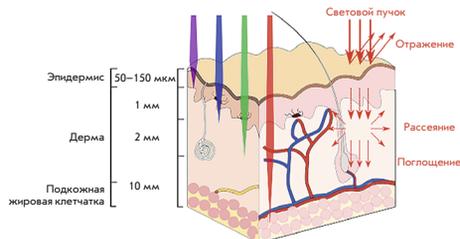
Г. Б. Телегин, А. С. Чернов, Н. А. Коновалов, А. А. Белогуров, И. П. Балмасова, А. Г. Габиров

Обобщены результаты экспериментальных исследований последних лет, посвященных изучению цитокинового профиля при травме спинного мозга. Проанализирована роль ведущих цитокинов в формировании клеточного ответа на травму. Рассмотрены данные иммунопатогенетических особенностей взаимодействия нервной и иммунной систем организма в остром и хроническом периодах после травмы. Показана целесообразность поэтапного подхода к оценке цитокинового профиля при травме спинного мозга, а также необходимость учета сочетания патогенетического и протективного компонентов в реализации регуляторных эффектов отдельных цитокинов, их интеграции в регенеративные процессы в поврежденном спинном мозге, что позволяет рационально подойти к организации лечебного процесса и разработке новых лекарственных препаратов.



Особенности иммунного ответа в острую фазу травмы спинного мозга

Цианиновые красители, активируемые в ближнем инфракрасном диапазоне, как агенты для фототермической терапии и диагностики опухолевых новообразований



Глубина проникновения света в ткани человека

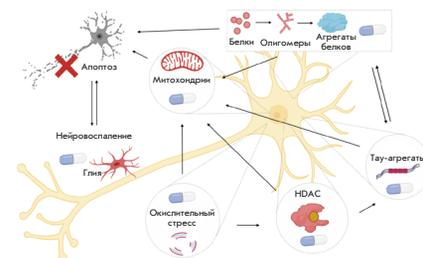
Е. И. Шрамова, А. Б. Котляр, Е. Н. Лебедеко, С. М. Деев, Г. М. Прошкина

В обзоре рассмотрены красители, поглощающие свет в ближнем ИК-диапазоне, обсуждена перспективность их использования для фототермической терапии и диагностики онкологических заболеваний. Особое внимание уделено рассмотрению новых многофункциональных наноплатформ для фототераностики, позволяющих достичь синергического эффекта, сочетая фототермическую и/или фотодинамическую терапию с флуоресцентной, акустической и/или магнитно-резонансной визуализацией.

Перспективные молекулярные мишени для фармакологической коррекции нейродегенеративных патологий

М. Е. Неганова, Ю. Р. Александрова, В. О. Небогатилов, С. Г. Ключков, А. А. Устюгов

В обзоре приведены данные о молекулярных механизмах значимых процессов развития нейродегенеративных заболеваний, таких, как: нейровоспаление и окислительный стресс, нарушение функционирования митохондрий, дисрегуляция экспрессии гистондеацетилаз и агрегация патогенных форм белка. Описаны терапевтические стратегии создания перспективных мультитаргетных низкомолекулярных препаратов, воздействующих на ключевые звенья нейродегенерации.



Молекулярные мишени для фармакологического воздействия при нейродегенеративных заболеваниях

Acta Naturae

ТОМ 12, № 3 (46), ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ 2020
издается с апреля 2009 года

Учредители:

ООО «Акта Натурэ»,
Национальный исследовательский университет
«Высшая школа экономики»

Редакционный совет:

Председатель: А.И. Григорьев
Главные редакторы: А.Г. Габибов, С.Н. Кочетков

В.В. Власов, П.Г. Георгиев, М.П. Кирпичников,
А.А. Макаров, А.И. Мирошников, В.А. Ткачук,
М.В. Угрюмов

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

К.В. Анохин (Москва, Россия),
И. Безпрозванный (Даллас, Техас, США),
И.П. Биленкина (Москва, Россия),
М. Блэкбёрн (Шеффилд, Великобритания),
Дж. Ву (Шанхай, Китай),
В.М. Говорун (Москва, Россия),
С.М. Деев (Москва, Россия),
О.А. Донцова (Москва, Россия),
К. Драуз (Ганау-Вольфганг, Германия),
М. Зуали (Париж, Франция),
М. Исагулянец (Стокгольм, Швеция),
А.Л. Конов (Москва, Россия),
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),
П. Массон (Гренобль, Франция),
В.О. Попов (Москва, Россия),
И.А. Тихонович (Москва, Россия),
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),
А. Фрибуле (Компьень, Франция),
В.К. Швядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Н.В. Соболева

Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева

Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин

Верстка: К.К. Опарин

Корректура: Р.С. Шаймарданова

Дизайн-проект: Х. Шнайдер

Адрес редакции: 101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 4

Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60

E-mail: actanaturae@gmail.com

При перепечатке материалов ссылка на журнал
Acta Naturae обязательна. Любое воспроизведение опубликованных
материалов без письменного согласия редакции не допускается.
Редакция не несет ответственность за достоверность информации,
опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAE, 2020

Номер подписан в печать 29 сентября 2020 г.

Тираж 100 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии: НИУ ВШЭ,

г. Москва, Кочновский проезд, 3

Включен в базы данных PubMed,
Web of Science, Scopus, РИНЦ

Журнал *Acta Naturae* входит
в Перечень ведущих периодических
изданий Высшей аттестационной комиссии
Минобрнауки России

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 1.360

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

А. В. Гапонова, С. Родин, А. А. Мазина,
П. Ю. Волчков

Эпителиально-мезенхимальный переход:
злокачественная прогрессия и перспективы
противоопухолевой терапии. 4

Е. В. Дудкина, В. В. Ульянова, О. Н. Ильинская
Надмолекулярная организация как фактор
цитотоксичности рибонуклеаз 24

О. В. Кисиль, Т. А. Ефименко,
Н. И. Габриэлян, О. В. Ефременкова
Разработка методов антимикробной терапии,
преодолевающих антибиотикорезистентность
Acinetobacter baumannii 34

П. А. Назаров, Д. Н. Балеев, М. И. Иванова,
Л. М. Соколова, М. В. Каракозова
Инфекционные болезни растений: этиология,
современное состояние, проблемы
и перспективы защиты растений 46

СОДЕРЖАНИЕ

М. Е. Неганова, Ю. Р. Александрова,
В. О. Небогатилов, С. Г. Клочков,
А. А. Устюгов
**Перспективные молекулярные мишени
для фармакологической коррекции
нейродегенеративных патологий. 60**

Е. Л. Соколинская, Д. В. Колесов,
К. А. Лукьянов, А. М. Богданов
**Молекулярные основы хеморецепции
насекомых 81**

Г. Б. Телегин, А. С. Чернов, Н. А. Коновалов,
А. А. Белогуров, И. П. Балмасова,
А. Г. Габибов
**Цитокиновый профиль как маркер клеточного
повреждения и иммунной дисфункции
при травмах спинного мозга 92**

Е. И. Шрамова, А. Б. Котляр,
Е. Н. Лебеденко, С. М. Деев, Г. М. Прошкина
**Цианиновые красители, активируемые
в ближнем инфракрасном диапазоне,
как агенты для фототермической
терапии и диагностики опухолевых
новообразований 102**

Б. С. Малышев, Н. А. Нетесова,
Н. А. Сметанникова, М. А. Абдурашитов,
А. Г. Акишев, Е. В. Дубинин, А. З. Азанов,
И. В. Вихлянов, М. К. Никитин, А. Б. Карпов,
С. Х. Дегтярев
**GLAD-ПЦР-анализ сайтов метилирования
ДНК в регуляторных областях
генов-онкосупрессоров
при раке желудка. 124**

М. П. Парамонова, А. Л. Хандажинская,
А. А. Озеров, С. Н. Кочетков, R. Snoeck,
G. Andrei, М. С. Новиков
**Синтез и противовирусные свойства
1-замещенных 3-[ω-(4-оксохиназолин-3
(4H)-ил)алкил]-производных урацила 134**

T. T. Dunston, M. A. Khomutov, S. B. Gabelli,
T. M. Stewart, J. R. Foley, S. N. Kochetkov,
A. R. Khomutov, R. A. Casero Jr.
**Identification of a Novel Substrate-Derived
Spermine Oxidase Inhibitor. 140**

Правила для авторов 145

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

И. В. Должикова, Д. М. Гроусова,
О. В. Зубкова, А. И. Тухватулин,
А. В. Ковыршина, Н. Л. Лубенец,
Т. А. Ожаровская, О. Попова,
И. Б. Есмагамбетов, Д. В. Щепляков,
И. М. Евграфова, А. А. Недорубов,
И. В. Гордейчук, С. А. Гуляев, А. Г. Ботиков,
Л. В. Панина, Д. В. Мишин, С. Я. Логинова,
С. В. Борисевич, П. Г. Дерябин,
Б. С. Народицкий, Д. Ю. Логунов,
А. Л. Гинцбург
**Доклинические исследования иммуногенности,
протективности и безопасности
комбинированной векторной вакцины
для профилактики ближневосточного
респираторного синдрома 114**

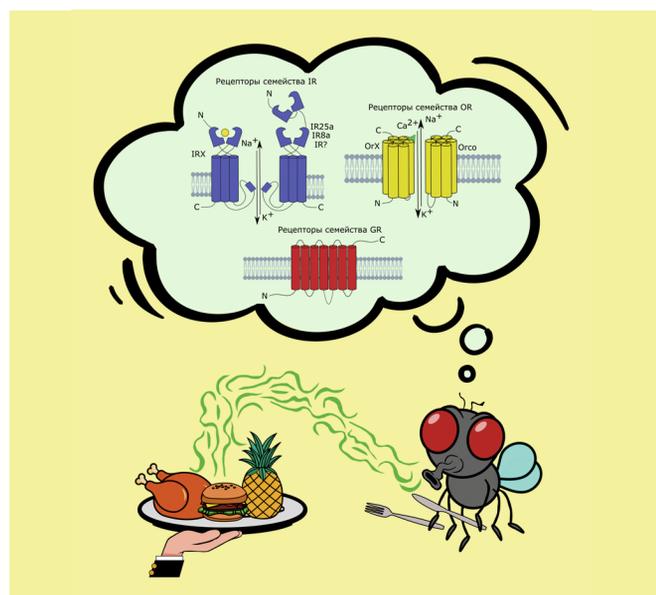


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Соколинской и др.)

УДК 577.29

Эпителиально-мезенхимальный переход: злокачественная прогрессия и перспективы противоопухолевой терапии

А. В. Гапонова^{1*}, С. Родин², А. А. Мазина¹, П. Ю. Волчков¹¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия²Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm, 17177 Sweden

*E-mail: annagaponova28@gmail.com

Поступила в редакцию 07.04.2020

Принята к печати 20.05.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11010

РЕФЕРАТ Примерно 90% всех злокачественных опухолей имеют эпителиальную природу. Эпителиальная ткань характеризуется тесной связью клеток между собой и тесной связью клеток с базальной мембраной, определяющей их полярность. Эти связи строго определяют положение клеток в пространстве и, казалось бы, противоречат способности многих опухолей к метастазированию (основной критерий злокачественности опухоли). Однако именно диссеминация опухоли из первичного источника в жизненно важные органы является основной причиной смертности пациентов при онкологической патологии. В основе опухолевой диссеминации лежит так называемый эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) – процесс, при котором эпителиальные клетки трансформируются в мезенхимальные, обладающие высокой подвижностью и способностью к миграции. Количество публикаций, освещающих роль ЭМП не только в процессах метастазирования, но и в других сторонах опухолевой прогрессии, растет с каждым годом, формируя активно расширяющуюся область научного интереса в онкологии. В обзоре рассмотрены последние данные о внутриклеточных и внеклеточных молекулярных механизмах, активирующих ЭМП, их роли в таких аспектах опухолевой прогрессии, как метастазирование, устойчивость к апоптозу и уход от иммунного надзора, которые ранее связывали исключительно с существованием так называемых стволовых опухолевых клеток. Подробно рассмотрены одобренные и перспективные для противоопухолевой терапии таргетные препараты, использующие в качестве мишени компоненты сигнальных путей ЭМП.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА эпителиально-мезенхимальный переход, метастазирование, стволовые опухолевые клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого; СОК – стволовые опухолевые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) – это физиологический процесс приобретения эпителиальными клетками свойств мезенхимальных клеток, причем как морфологических (изменение формы), так и физиологических (способность к подвижности, инвазии, глобальное изменение профиля экспрессии и метаболизма).

Клетки эпителия организованы в клеточные слои, связаны между собой межклеточными контактами и крепятся к базальной мембране, и, хотя возможна некоторая перестройка формы клеток, движение

эпителиальных клеток в значительной степени ограничено пределами эпителиального слоя. Среди межклеточных контактов, соединяющих эпителиальные клетки, выделяют так называемые адгезионные контакты (adherence junctions), плотные контакты (tight junctions) на основе E-кадгерина, связанные с актиновым цитоскелетом, а также щелевые контакты (gap junctions) и полудесмосомы (hemidesmosomes), связанные с промежуточными филаментами на основе цитокератинов.

Ключевыми компонентами эпителиальных клеточных контактов являются трансмембранный

Е-кадгерин и β -катенин, связывающий кадгерин с актиновым цитоскелетом. У позвоночных идентифицировано более 100 типов кадгеринов с различной тканевой специфичностью [1], что обеспечивается высоким разнообразием генов, кодирующих различные кадгеринины, и процессами альтернативного сплайсинга. Контакты между клетками эпителиальной ткани позвоночных образованы гомодимерами Е-кадгерина.

Кадгеринины – это трансмембранные белки, состоящие из внеклеточной кальцийсвязывающей части, образованной пятью доменами, трансмембранной части, представленной одиночной цепью гликопротеиновых повторов, и цитоплазматической части, соединенной с β -катенином и белком p120, стабилизирующим кадгерин на поверхности клетки. β -Катенин соединяет цитоплазматическую часть кадгерина с α -катенином [2, 3], связанным с актином цитоплазматического скелета, и регулирует сборку актиновых филаментов, подавляя опосредованную Arp2/3 полимеризацию актина [4]. Исправная работа этого белкового комплекса обеспечивает не только межклеточную адгезию, но и координацию динамики цитоскелета, контроль движения клеточных пластов в ходе эмбриогенеза, а также морфогенеза и гомеостаза ткани [5, 6].

Мезенхимальные клетки и фибробласты в отличие от клеток эпителия не обладают апикально-базальной полярностью, имеют веретеновидную форму и, несмотря на наличие участков фокальной адгезии к внеклеточному матриксу, могут перемещаться в трех измерениях, проходя вдоль коллагеновых сетей внеклеточного матрикса и сквозь них [7, 8].

Явление эпителиально-мезенхимального перехода впервые было описано в начале 1980-х в лаборатории Elizabeth Hay [9, 10] как на эмбриональных эпителиальных клетках ното хорды и хрусталика, выделенных из куриных эмбрионов, так и на дифференцированных эпителиальных клетках хрусталика. Эпителиальные клетки, помещенные в трехмерный коллагеновый матрикс *in vitro*, демонстрировали морфологические изменения – приобретали веретенообразную биполярную форму с длинными клеточными отростками, псевдоподиями и филоподиями, а также проникали в трехмерный коллагеновый матрикс [9].

В ходе ЭМП в эпителиальных клетках подавляется экспрессия Е-кадгерина и других компонентов плотных и адгезионных контактов, что ведет к утрате межклеточной адгезии и апикально-базальной полярности, реорганизации цитоскелета и увеличению подвижности. Подавление экспрессии эпителиальных генов происходит в сочетании с повышенной экспрессией факторов транскрипции и ассоциирован-

ных мезенхимальных генов, таких, как N-кадгерин, виментин, фибронектин и металлопротеиназы внеклеточного матрикса [11–13]. Изменение профиля экспрессии генов, ответственных за формирование эпителиального и мезенхимального фенотипов, считается ключевой характеристикой ЭМП.

ТИПЫ ЭМП

В самых первых экспериментах в лаборатории Elizabeth Hay [9], в которых обнаружили существование ЭМП, было показано, что данный процесс характерен и для стволовых, и для дифференцированных клеток. Несмотря на сходство молекулярных механизмов, лежащих в основе ЭМП, и общий результат – образование подвижных клеток с мезенхимальным фенотипом из прикрепленных эпителиальных клеток с апикально-базальной полярностью в эмбриональных и дифференцированных клетках, они несут принципиально разную функциональную нагрузку.

В зависимости от биологического контекста ЭМП принято делить на три подтипа: тип I, возникающий в ходе эмбриогенеза [14–16] и морфогенеза органов [17–19]; тип II, связанный с регенерацией раневых повреждений [20, 21] и патологическими склеротическими процессами [22–26]; тип III, ассоциированный с метастазированием опухолей.

ЭМП типа I – наиболее ранний тип, впервые наблюдаемый в ходе имплантации, когда внезародышевые клетки трофобласта претерпевают эпителиально-мезенхимальную трансформацию и мигрируют из тела бластоцисты в эндометрий матки, способствуя формированию прикрепленной плаценты [27, 28].

Следующее событие, связанное с ЭМП и возникающее после имплантации, – образование первичной мезодермы из первичной эктодермы в ходе гаструляции [29–31]. ЭМП является одним из механизмов, посредством которых осуществляется ингрессия (выселение) части клеток стенки бластулы (бластодермы, примитивной эктодермы), по гистологическому строению представляющей собой слой эпителия, внутрь бластоцеля. Миграция клеток осуществляется в определенный участок эмбриона, так называемую первичную полосу (the primitive streak). Далее в ходе инвагинации при участии механизмов ЭМП из клеток первичной полосы формируется мезо- и эндодерма [15]. Сигнальный путь Wnt/ β -катенин лежит в основе регуляции данных процессов.

Другое важное событие, происходящее при участии ЭМП, – формирование нервного гребня. Нервный гребень представляет собой совокупность клеток, выделяющихся из краевых отделов нервного желоба (нейроэктодерма) в ходе замыкания нервной трубки [32]. Популяция прекурсорных клеток нерв-

ного гребня обладает высокой способностью к миграции по всему эмбриону и участвует в формировании самых разнообразных структур в организме: вегетативных ганглиев нервной системы, меланцитов кожи, хрящей лицевого черепа, хромоаффинных клеток надпочечников и сердечных клапанов. Как и при ЭМП, описанном в ходе гастрюляции, будущие клетки нервного гребня, отсоединяясь от нейроэпителия, теряют способность к клеточной адгезии, опосредованную N-кадгеринами. Происходит фрагментация базальной мембраны, усиление экспрессии генов, ответственных за формирование мезенхимального фенотипа, увеличение подвижности и последующая активная инвазия [33]. Миграция клеток нервного гребня индуцируется преимущественно сигнальным путем морфогенетического белка кости (BMP) и его ингибитором. Кроме того, одними из важнейших индукторов и регуляторов ЭМП в ходе формирования нервного гребня являются компоненты внеклеточного матрикса – высокие уровни фибронектина и гиалуроновой кислоты характерны для областей, в которые мигрируют клетки будущего нервного гребня [34].

ЭМП типа I участвует в морфогенезе сердечных клапанов и вторичного неба. Зачатки митрального и трикуспидального клапанов, а также межжелудочковой перегородки сердца формируются в ходе эпителиально-мезенхимального перехода зародышевых клеток эндотелия при участии сигнальных путей TGF- β [35]. Кроме того, недавние исследования показали важность сигнального пути Wnt и гиалуроновой кислоты для процессов ЭМП при морфогенезе сердца [36]. ЭМП в области небного шва, регулируемый TGF- β 3, лежит в основе правильного морфогенеза лицевой части черепа, в частности, формирования вторичного неба. Активированные TGF- β 3 факторы транскрипции SNAIL1 и SIP1 в сочетании со Smad4 связываются с промотором гена E-кадгерина, вызывая репрессию его транскрипции [37].

ЭМП типа II, в отличие от типов I и III, вызывается исключительно повреждением и воспалением [38]. ЭМП типа II является частью сложного процесса заживления ран и регенерации поврежденных тканей, играя важную роль как в реэпителизации ткани, так и в формировании грануляционной ткани. Реэпителизацией называют процесс, в ходе которого эпидермальные кератиноциты становятся подвижными, приобретают мезенхимальный фенотип и мигрируют к краю раны, где начинается их пролиферация и восполнение поврежденного участка до встречи с эпителиальными клетками противоположного края раны. С этого момента дальнейшая клеточная миграция прекращается благодаря феномену контактного ингибирования [39].

Заживление раны происходит не только благодаря реэпителизации, но и параллельно протекающему процессу ремоделирования – формирования грануляционной рубцовой ткани, главным участником которого являются миофибробласты, продуцирующие большие количества белков внеклеточного матрикса [40]. Описаны различные источники возникновения миофибробластов [41, 42], в том числе и их образование в ходе ЭМП [43].

После завершения реэпителизации миофибробласты подвергаются апоптозу [44], в то время как при нарушении регуляции ЭМП и патологически пролонгированной активности миофибробластов, вызванных хроническим (в частности, воспалительным) повреждением, возникает фиброз органов, их деструкция и нарушение функции. Кроме того, TGF- β 1, один из важнейших индукторов ЭМП, регулирующий также процессы физиологического заживления ран, считается основной движущей силой фиброза [45], частично благодаря его роли в активации миофибробластов [44, 46].

Помимо TGF- β , такие факторы роста, как FGF, HGF, EGF – известные индукторы ЭМП, задействованы в процессах заживления ран [47]. В процессы реэпителизации вовлечен также важный для ЭМП транскрипционный фактор Slug: у мышей с нокаутом Slug снижена способность к заживлению ран [20], что, очевидно, связано с нарушением миграции эпидермальных кератиноцитов [48].

Наименее изучен ЭМП типа III, характерный для опухолей, эпителиальные клетки которых значительно отличаются от нормальных клеток неограниченным репликативным потенциалом и интенсивной пролиферацией, резистентностью к сигналам, блокирующим рост и пролиферацию, а также к сигналам апоптоза, геномной нестабильностью и дерегуляцией метаболизма, уклонением от иммунного надзора и интенсивным ангиогенезом [49].

Одна из ключевых черт опухолевых клеток – их способность к инвазии, миграции и формированию метастатических очагов во внутренних органах [49]. Множество работ на моделях как *in vitro*, так и *in vivo* показывают роль активации программы ЭМП в процессах инвазии и метастазирования различных типов рака [50–53]. Кроме того, мезенхимальный фенотип опухолевых клеток и экспрессия маркеров ЭМП ассоциированы с устойчивостью к химио- [54], радио- [55] и иммунотерапии [56], сигналам старения и апоптоза [57, 58], а повышенная экспрессия N-кадгерина, виментина – и с уходом от иммунологического надзора [59].

Описаны многие молекулярные механизмы, лежащие в основе ЭМП типа III, сходные с программами ЭМП типов I и II, описанными ранее. Однако суще-

ствуют некоторые особенности процессов ЭМП, которые клетки опухоли используют для диссеминации, а механизмы, индуцирующие ЭМП в опухолях, остаются малоизвестными, и их роль в прогрессии рака ставится под сомнение и является предметом споров. Высказано предположение, что изменение экспрессии маркеров, ассоциированных с ЭМП, связано лишь с нестабильностью генома опухолевой клетки и не указывает на запуск программы, характерной для эмбриогенеза [60].

Далее мы опишем особенности как внутриклеточных, так и внеклеточных молекулярных механизмов (влияние опухолевого микроокружения) ЭМП, лежащего в основе разных аспектов прогрессии опухолей. Также мы подробно обсудим возможность их применения в качестве молекулярных мишеней противоопухолевой терапии и маркеров ранней диагностики рака.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭМП В КОНТЕКСТЕ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ (ВНЕШНИЕ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЫ)

Внутриклеточные сигналы

Координация внутриклеточных сигналов, лежащих в основе нормальных процессов ЭМП, может быть нарушена из-за дисрегуляторных стимулов, исходящих от измененного клеточного микроокружения, способствуя развитию фиброза и опухолевой прогрессии.

Внутриклеточные сигналы, регулирующие ЭМП, разнообразны и достаточно хорошо изучены (рис. 1). Наиболее подробно описана роль сигнальных путей (TGF)- β /BMP (выделяют SMAD-зависимые

и SMAD-независимые варианты этого сигнального пути в контексте ЭМП), Wnt- β -катенин, Notch, Hedgehog, рецепторных тирозинкиназ, таких, как EGF, FGF, IGF и PDGF, а также роль ключевых факторов транскрипции (экспрессия которых регулируется вышеуказанными рецепторными молекулами и сигнальными путями) SNAIL1, SNAIL2 (также известного как Slug), ZEB1, ZEB2 и TWIST, выступающих в качестве репрессоров экспрессии E-кадгерина, и других генов, ответственных за формирование эпителиального фенотипа [61] (рис. 1).

Кроме того, SNAIL1 и ZEB2 активируют экспрессию металлопротеиназ, которые способствуют деградации базальной мембраны и инвазии [62]. Также выделяют эпигенетические механизмы регуляции ЭМП, связанные с метилированием и ацетилизацией гистонов и микроРНК. Активация упомянутых молекулярных механизмов обеспечивает формирование новых характеристик, так называемых маркеров ЭМП, а именно повышенную экспрессию N-кадгерина, виментина, фибриллярного коллагена типа 1, β -катенина, репрессию E-кадгерина, клаудинов, белка zona occludens 1, окклюдина, цитокератинов и активацию матриксных металлопротеиназ (рис. 2).

Транскрипционный фактор ZEB1 играет ключевую роль в регуляции ЭМП в клетках рака поджелудочной железы и метастатическом процессе, подавляя экспрессию E-кадгерина через привлечение деацетилаз HDAC1 и HDAC2 к промоторной области гена *Cdh1* [63, 64]. Подавление сигнального пути TGF- β с использованием микроРНК miR-202 блокирует ЭМП в клетках рака поджелудочной железы [65].

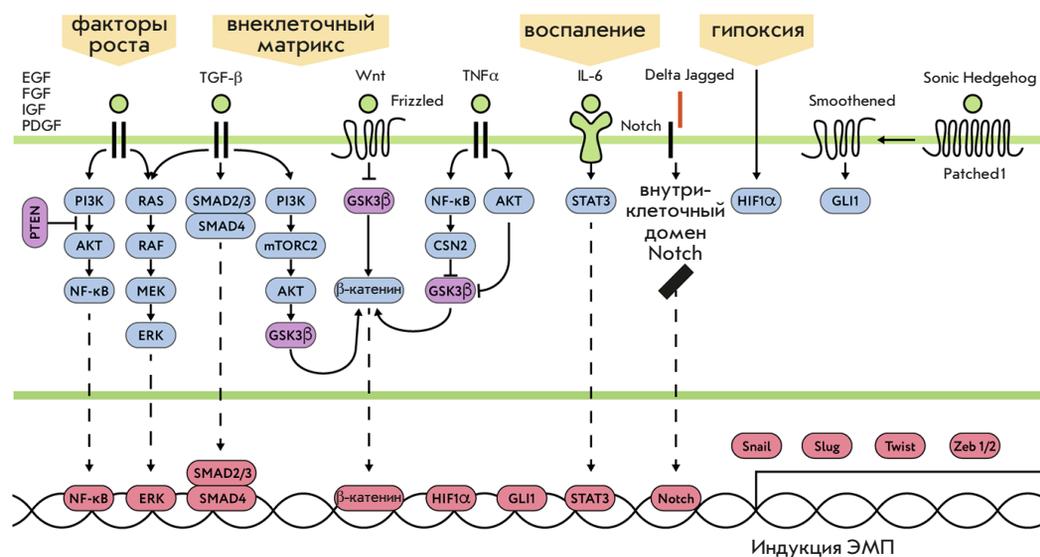


Рис. 1. Ключевые сигнальные пути регуляции ЭМП. Синим цветом обозначены компоненты передачи сигнала, обеспечивающие индукцию ЭМП, фиолетовым – компоненты, подавляющие ЭМП. Красным цветом обозначены транскрипционные факторы, активирующие процессы ЭМП

Транскрипционный фактор ETS1, высокий уровень экспрессии которого (по сравнению с нормальной тканью) характерен для образцов опухолевой ткани предстательной железы, активирует ЭМП через индукцию сигнального пути TGF-β с последующей активацией ZEB1 и SNAIL1 [66]. Недавно показано, что в регуляции ЭМП и инвазии клеток рака предстательной железы участвует кальциевый ионный канал TRPM4, который индуцирует экспрессию SNAIL1 [67].

Выявлено также участие протоонкогена *c-Myc* в индукции ЭМП и стволовых опухолевых клеток (СОК) через сигнальный путь Wnt и активацию ZEB1 в клетках тройного негативного рака молочной железы (РМЖ) [68]. Кроме того, сверхэкспрессия miR-93 в клетках РМЖ, подавляющая онкосупрессор PTEN (рис. 1), связана с ЭМП и устойчивостью опухоли к цитотоксическому действию доксорубицина [69].

Ингибин В (INHBB) – мембранный гликопротеин, относящийся к суперсемейству TGF-β, и Smad-зависимый сигнальный путь TGF-β регулируют процессы ЭМП и апоптоза в клетках плоскоклеточного рака головы и шеи [70]. Сигнальные пути TGF-β/SNAIL1 и TNFα/NF-κB определяют течение процессов ЭМП при колоректальном раке [71, 72] (рис. 1). Последние исследования описывают новые молекулярные регуляторы ЭМП, вовлеченные в метастазирование рака легкого [73–75].

Внеклеточные стимулы

В активации внутриклеточных сигнальных путей участвуют различные стимулы местного микроокружения, такие, как факторы роста, цитокины, гипоксия и контакт с окружающим внеклеточным матриксом (опухоль-ассоциированной стромой) (рис. 1). Факторы опухолевого микроокружения влияют на выживаемость, пролиферацию и прогрессию рака, с чем связано их активное изучение.

Воспаление считается критическим фактором развития опухоли. Хронический воспалительный процесс повышает риск развития рака; около 20% онкологических заболеваний связаны с хроническим воспалением, вызванным инфекциями, аутоиммунными реакциями и повреждением. Кроме того, сами онкогенные сигнальные пути в клетках, подверженных злокачественной трансформации, индуцируют активацию воспалительных сигнальных путей. Таким образом, инфильтрация опухолевой ткани иммунными клетками и повышенная экспрессия провоспалительных цитокинов обнаруживается в большинстве типов опухоли независимо от того, вовлечено ли в их развитие внешнее воспаление [76]. На данный момент получено множество под-

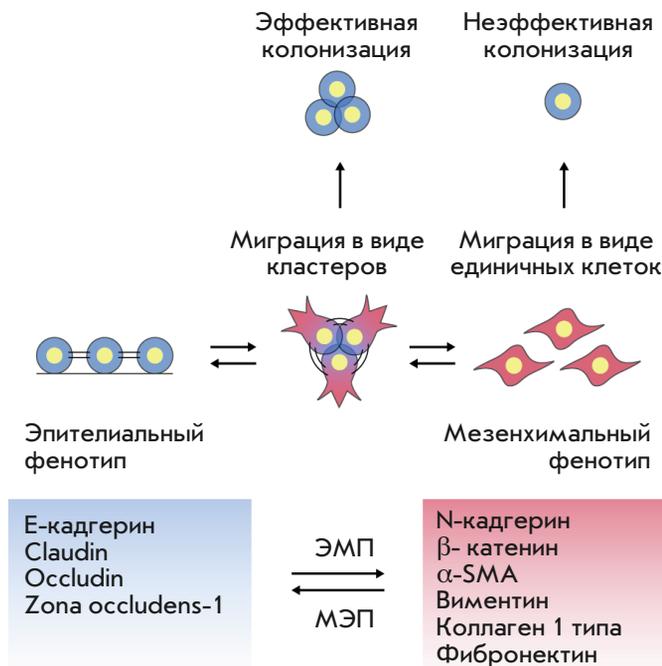


Рис. 2. Клеточная пластичность и роль промежуточно-эпителиально-мезенхимального фенотипа в формировании вторичных опухолевых очагов (подробное объяснение в тексте)

тверждений участия различных клеточных и гуморальных компонентов воспаления в индукции ЭМП и метастазирования [77] (рис. 1).

Активный рост опухоли связан также с нарушением васкуляризации, вследствие чего формируются области временной или хронической гипоксии. Гипоксия и индукция связанных с ней молекулярных эффикторов HIF (hypoxia induced factors) являются признаками многих опухолей. HIF регулируют экспрессию генов, отвечающих за выживание, пролиферацию, подвижность, метаболизм, регуляцию pH, привлечение факторов воспаления и процессы ангиогенеза. Таким образом, индукция HIF способствует прогрессии рака, в частности, как и в случае фиброза, активирует процессы ЭМП и метастазирования во многих типах рака [78–81] (рис. 1).

Ламинины – белки внеклеточного матрикса, представляющие собой гетеротримерные гликопротеины, составляют основную часть базальной мембраны, находящейся в прямом контакте с эпителиальными клетками и обеспечивающей передачу необходимых сигналов к клеткам [82]. Ламинины способны регулировать процессы поляризации и миграции, влияя на эпителиальные и мезенхимальные характеристики клеток в ходе нормального онтогенеза и заживления ран.

Фрагмент ламинина-111, возникший в результате расщепления матриксной металлопротеиназой MMP2, усиливает экспрессию E-кадгерина и за счет подавления SNAIL1 и SNAIL2 в эмбриональных стволовых клетках мыши [83].

В клетках эпителия молочной железы мышей, которые обычно подвергаются Rac1b-зависимому ЭМП при обработке матриксной металлопротеиназой-3 (MMP3), ламинин-111 также ингибирует переход к мезенхимальному фенотипу [84]. Активация Rac1b (вариант сплайсинга малой GTP-азы Rac1), опосредованная взаимодействием между ламинином-111 и его рецептором $\alpha 6$ -интегрином, связана с усилением экспрессии эпителиального маркера кератина-14 и подавлением мезенхимальных маркеров SNAIL1, α -гладкомышечного актина и виментина. Другой белок внеклеточного матрикса – фибронектин, напротив, стимулирует ЭМП в клетках молочной железы, взаимодействуя с его рецептором $\alpha 5$ -интегрином [84].

Фрагмент ламинина-111, расщепленного MMP2, также препятствует процессам фиброза ткани *in vivo* [85]. *In vitro* взаимодействие фрагмента с $\alpha 3\beta 1$ -интегрином ослабляет TGF- $\beta 1$ -индуцированное фосфорилирование Smad3 и активацию SNAIL1 в перитонеальных клетках мыши, ингибирует мезотелиально-мезенхимальный переход [85], который является разновидностью ЭМП.

Кроме того, опухолевая прогрессия в значительной степени определяется ламининами [86], а некоторые изоформы ламинина способствуют миграции опухолевых клеток [87–89].

Ламинины, особенно ламинины базальной мембраны, считаются ключевым фактором, определяющим прикрепление и полярность эпителиальных клеток. Утрата связывания и прикрепления клеток к базальной мембране через ламинины связана, очевидно, с потерей полярности (одного из первых этапов ЭМП) и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом опухолевого процесса [90]. ЭМП обычно ассоциирован с потерей экспрессии компонентов базальной мембраны [91], таким образом, некоторые цепи ламининов можно рассматривать в качестве маркеров ЭМП.

Транскрипционные факторы, регулирующие ЭМП, непосредственно влияют на экспрессию ламинина. SNAIL1 подавляет $\alpha 5$ -цепь ламинина и усиливает экспрессию $\alpha 4$ -цепи в клетках плоскоклеточного рака полости рта [92]. ZEB1 подавляет экспрессию $\alpha 3$ -цепи ламинина и коллагена типа IV (также составляющего основную часть базальной мембраны) в клеточных линиях колоректального рака, но увеличивает экспрессию $\gamma 2$ -цепи ламинина [91]. Известно, что $\gamma 2$ -цепи ламинина накапливаются на фронтальном участке инвазии злокачественных опухолей [93] не как часть зрелых тримеров

ламинина или базальной мембраны, а в виде мономеров [94].

Показано также, что ламинины могут непосредственно влиять на процессы ЭМП в клетках опухоли. В клетках гепатоцеллюлярной карциномы передача сигналов ламинина-332 через $\alpha 3$ -интегрин усиливает экспрессию SNAIL1 и SNAIL2 и подавляет экспрессию E-кадгерина [95]. Тем не менее, участие ко-стимулирующих сигналов через TGF- $\beta 1$ необходимо для завершения ЭМП и формирования инвазивного фенотипа [95].

Другие компоненты внеклеточного матрикса – фибронектин и коллаген – также играют важную роль в опухолевой прогрессии. Многие исследования указывают на связь коллагена типа 1 с процессами ЭМП и инвазии. Изоформа A1 коллагена-1 вносит важный вклад в прогрессию немелкоклеточного рака легкого и ассоциирована с ЭМП [96]. Прогрессия рака желудка также коррелирует с экспрессией коллагена типа 1 [97]. Кроме того, коллагеновые фибриллы в метастатических опухолях легкого характеризуются более высокой организацией в результате сшивания коллагена лизилоксидазой (LOX). Экспрессия изоформ лизилоксидазы (LOX и LOXL2) регулируется непосредственно miR-200 и ZEB1, ключевыми регуляторами ЭМП. Стабилизация коллагеновых фибрилл, вызванная действием лизилоксидазы, повышает жесткость внеклеточного матрикса и активирует сигнальный путь интегрин- $\beta 1$ /FAK/Src через коллаген типа 1, запуская процессы инвазии и метастазирования при раке легкого [96]. Сходным образом TGF- $\beta 1$ индуцирует экспрессию LOXL2 и стабилизацию коллагена типа 1 в клетках гепатоцеллюлярной карциномы, способствуя формированию инвазивной и опухолевой инвазии [98].

Повышение жесткости внеклеточного матрикса за счет стабилизации коллагена индуцирует TWIST-зависимый ЭМП и служит негативным прогностическим маркером при раке молочной железы [99]. Таким образом, изменение физических характеристик внеклеточного матрикса, таких, как жесткость, может инициировать процессы ЭМП посредством механической трансдукции сигнала опухолевыми клетками, способствуя инвазии и метастазированию [99].

Еще один маркер ЭМП – фибронектин – компонент внеклеточного матрикса, обеспечивает связь коллагеновых волокон и молекул интегринов на поверхности клеток [100]. Изоформы фибронектина, содержащие домен ED-B, не экспрессируются в нормальных тканях взрослого организма. Эти изоформы экспрессируются только в опухолевой строме или в эмбриональном развитии, т.е. их также можно рассматривать в качестве перспективного опухолевоспецифичного маркера ЭМП [101].

КЛЕТОЧНАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ И ОПУХОЛЕВАЯ ПРОГРЕССИЯ

Процессы ЭМП лежат в основе широкого спектра функций на разных этапах развития организма, в разных органах и тканях, что, очевидно, обусловлено многообразием молекулярных механизмов регуляции. В широком же смысле процессы ЭМП определяют общее свойство – так называемую клеточную пластичность – способность клеток к изменению фенотипа и функции в определенных условиях. Кроме того, клеточная пластичность выражается и в том, что часто клетки, подверженные ЭМП, продвигаются в направлении мезенхимального состояния лишь частично (partial EMT) (рис. 2). Более того, процессы ЭМП могут иметь обратимый характер. Все эти процессы необходимы для нормального развития, при этом пластичность исходной клетки, трансформирующейся в опухолевую, утилизируется онкогенными механизмами в совершенно ином, патологическом, контексте. На сегодняшний день накоплены данные о критической роли частичного ЭМП и обратного процесса – мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП) в процессах инвазии и метастазирования (рис. 2).

В отличие от полноценного ЭМП, реализуемого в ходе эмбриогенеза, опухолевые клетки, как правило, редко подвергаются полной трансформации в клетки мезенхимального типа [64, 67, 102–106], формируя гибридный эпителиальный/мезенхимальный фенотип, что выражается в коэкспрессии как эпителиальных, так и мезенхимальных маркеров. Причем разные типы рака имеют свой набор коэкспрессирующихся маркеров, что, вероятно, связано с превалирующей ролью в прогрессии тех или иных сигнальных путей, описанных выше (рис. 2).

Удивительно, но определенные популяции опухолевых клеток сохраняют высокий уровень экспрессии E-кадгерина, ключевой молекулы для поддержания эпителиального фенотипа, что, однако, не мешает формированию промежуточного эпителиально/мезенхимального фенотипа и способности к инвазии и миграции [103, 107–112].

Необходимость ЭМП для формирования метастазов даже была поставлена под сомнение в работах с трансгенными *in vivo* моделями рака молочной [113] и поджелудочной [114] железы. Однако впоследствии доказали несостоятельность этой экспериментальной модели, используемой Fischer и соавт. [113], а также ошибочный выбор генов *Fspl* и *Vim* в качестве мезенхимальных маркеров (низкий уровень экспрессии в клетках рака молочной железы, подверженных ЭМП) [115]. В то же время ключевая роль SNAIL1 в регуляции ЭМП и метастазировании при раке молочной железы показана в нескольких независимых

исследованиях [116, 117]. Сомнения вызывают выводы, сделанные на основе факторов SNAIL1 и TWIST, согласно которым ЭМП не участвует в метастазировании рака поджелудочной железы [118]. Кроме того, установлено, что нокадаун *ZEB1* в той же трансгенной *in vivo* модели ассоциирован с потерей клеточной пластичности (фиксацией эпителиального фенотипа опухолевыми клетками), снижением инвазии и метастатической способности [64]. Более того, с использованием различных трансгенных *in vivo* моделей обнаружено, что экспрессия E-кадгерина и p120-катенина обуславливает органотропизм метастатического поражения при раке поджелудочной железы, а именно, формирование метастазов в печени, тогда как для формирования метастазов в легких экспрессия этих белков не требуется [112].

Исследование опухолевого материала, полученного от пациентов с метастатическим раком молочной железы, выявило важное клиническое значение коэкспрессии E-кадгерина и виментина: высокий уровень E-кадгерина/позитивное окрашивание на виментин; низкий уровень E-кадгерина/позитивное окрашивание на виментин ассоциированы с наиболее агрессивной трижды негативной формой заболевания. Однако наиболее неблагоприятный прогноз десятилетней безрецидивной выживаемости ассоциирован именно с высоким уровнем E-кадгерина/позитивным окрашиванием на виментин. Кроме того, сравнение уровней экспрессии E-кадгерина в первичных опухолях и соответствующих метастазах в лимфатические узлы показало, что чаще всего уровень E-кадгерина в метастазах не изменен (46% случаев) или повышен (43% случаев) по сравнению с первичным опухолевым очагом, а снижен – лишь в 11% случаев [119].

Таким образом, молекулярные механизмы, лежащие в основе гибридного эпителиального/мезенхимального фенотипа, недостаточно понятны [120] и зачастую с трудом объясняются лишь устоявшейся концепцией подавления/активации транскрипции соответствующих «эпителиальных» и «мезенхимальных» генов. В некоторых случаях возможно нарушение функции E-кадгерина, вызванное мутациями в гене *Cdh1* или же связанное с aberrантными сигналами опухолевого микроокружения [121], причем нарушение функции не обязательно связано со снижением адгезионной способности, но и, как ни удивительно, может быть ассоциировано с ее повышением и конститутивной активацией, в некоторых случаях важной для процессов метастазирования [110].

Недавно с использованием репортерной линии мышей в качестве *in vivo* модели рака поджелудочной железы Aiello и соавт. подтвердили существование двух возможных программ ЭМП, осуществляемых

в ходе опухолевой инвазии – полноценного и промежуточного ЭМП. Полноценный ЭМП характеризуется снижением транскрипции гена E-кадгерина и увеличением транскрипции виментина. При промежуточном ЭМП сохраняется экспрессия мРНК E-кадгерина и повышена транскрипция гена виментина (промежуточный ЭМП также характеризуется более низкой экспрессией факторов транскрипции ETV1, PRRX1, ZEB1, TWIST1, SNAIL1, SNAIL2 и ZEB2 по сравнению с полноценным ЭМП). Причем промежуточный ЭМП наблюдали в большинстве опухолей мышечной модели, преобладание данной программы ЭМП показано также на опухолевых клетках человека (рака молочной железы и колоректального рака). В ходе иммуноцитохимического исследования выявлено отсутствие поверхностного окрашивания опухолевых клеток, подверженных промежуточному ЭМП, на E-кадгерин. Впервые показан механизм промежуточного ЭМП, связанный с рециркуляцией поверхностных белков и релокализацией поверхностного E-кадгерина в поздние эндосомы [107].

Программы ЭМП связаны с различными способами инвазии. Опухолевые клетки, использующие программу промежуточного ЭМП, мигрируют как многоклеточные кластеры с сохранением межклеточных контактов, они способны также к миграции в виде единичных клеток, в отличие от полноценного ЭМП, в ходе которого наблюдаются инвазия и миграция только единичных клеток [107] (рис. 2). Коллективную миграцию кластеров опухолевых клеток [64, 109, 110, 122, 123], подверженных промежуточному ЭМП [106, 123, 124] в ходе инвазии, подтверждают результаты многих исследований.

Хотя большинство клеток, составляющих такие кластеры, экспрессируют E-кадгерин и сохраняют межклеточные контакты, опухолевые клетки по краям кластера не экспрессируют E-кадгерин и обладают более выраженным мезенхимальным фенотипом. Таким образом, «лидирующие» клетки кластера претерпевают завершение программы ЭМП для усиления подвижности, продукции металлопротеиназ, разрушающих внеклеточный матрикс, способствуя активной инвазии всего кластера, включая составляющие его более эпителиальные клетки [105, 107, 110, 111, 125].

Важно отметить, что метастазирование является неэффективным процессом: лишь небольшая часть циркулирующих опухолевых клеток не будет элиминирована и даст начало вторичным опухолевым очагам [126], причем, несмотря на меньшее количество циркулирующих кластеров опухолевых клеток по сравнению с единичными опухолевыми клетками, гораздо чаще метастазы возникают в результате колонизации именно кластеров опухолевых клеток

[127–129]. Более того, кластер обуславливает поликлональность вторичных опухолевых очагов [110, 130–132].

Циркуляция кластеров опухолевых клеток с промежуточным ЭМП, обнаруженная в крови пациентов с раком молочной железы, легкого, предстательной железы и колоректальным раком [124, 133–135], ассоциирована с негативным прогнозом: низким уровнем выживаемости, высоким риском рецидива и устойчивостью к химиотерапии [130, 136–139].

Процесс формирования метастазов опухоли является многоэтапным. Помимо процессов инвазии, миграции и экстравазации (проникновение опухолевых клеток через стенку кровеносного сосуда в ткань), он включает процесс колонизации (пролиферация опухолевых клеток во вторичном очаге), который связывают с противоположным процессом – мезенхимально-эпителиальным переходом, что в очередной раз подчеркивает важность клеточной пластичности для опухолевой прогрессии. Метастазы образованы эпителиальными клетками общей с клетками первичного очага морфологией, характеризующейся реэкспрессией эпителиальных маркеров и репрессией факторов ЭМП [51, 106, 140–143].

Молекулярные механизмы, лежащие в основе МЭП, менее изучены и, как правило, связаны с подавлением программы ЭМП (рис. 2). Существенную роль в подавлении программы ЭМП в различных типах рака играют микроРНК (miRNA) – небольшие некодирующие РНК, регулирующие экспрессию генов-мишеней на посттранскрипционном уровне [144–151].

Однако существуют механизмы, непосредственно стимулирующие формирование эпителиального фенотипа. Фактор роста и дифференцировки 10 (Growth differentiation factor-10 (GDF10), известный также как морфогенетический белок кости 3В (BMP-3В)), подавляет миграцию и инвазию клеток плоскоклеточного рака головы и шеи, экспрессию виментина, увеличивает экспрессию E-кадгерина и чувствительность опухолевых клеток к цитотоксической терапии через индукцию апоптоза, а снижение экспрессии GDF10, характерное для данного типа рака, ассоциировано со снижением общей выживаемости пациентов. Интересно, что экспрессия GDF10 опосредована SMAD2/3-зависимыми активными сигналами от рецептора TGF- β типа III (TGFB3), экспрессия которого также снижена при этом типе рака. Кроме того, репрессия GDF10 опосредуется сигналами RK, а не классическими для ЭМП сигналами TGF- β [152].

Изоформа Cx32 белка коннексина – компонента щелевых контактов, стимулирует МЭП в клетках гепатоцеллюлярной карциномы [153]. Cx32 является супрессором гепатоканцерогенеза и метастати-

ческого процесса в клетках печени, его экспрессия в клетках гепатоцеллюлярной карциномы снижена по сравнению с нормальной тканью печени [153]. Как известно, мезенхимальный фенотип опухолевых клеток ассоциирован с устойчивостью к апоптозу и цитотоксической химиотерапии, а ЭМП принято считать одним из механизмов резистентности. Интересно, что полученная Yu и соавт. [153] линия гепатоцеллюлярного рака с устойчивостью к ДНК-повреждающему препарату доксорубину имеет признаки ЭМП. Таким образом, постулируется существование индуцированного химиотерапией ЭМП, связанного со снижением экспрессии E-кадгерина и Sx32, а также с усилением экспрессии виментина. Сверхэкспрессия Sx32 в клетках, резистентных к доксорубину, индуцирует МЭП, связанный с сверхэкспрессией E-кадгерина и снижением экспрессии виментина. Однако стоит отметить, что в отсутствие экспериментов, подтверждающих сенситизацию клеток со сверхэкспрессией Sx32 к действию доксорубина, несколько самонадеянно заявлять о роли Sx32 в регуляции чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии и возможности его использования в качестве мишени для терапии, основываясь лишь на потенциальной связи фенотипа и чувствительности клеток [153]. Роль различных изоформ коннексина в метастазировании показана также при раке почки [154] и меланоме [155].

Другой важный индуктор МЭП – транскрипционный фактор GRHL2, активирующий экспрессию различных молекул эпителиальной адгезии и подавляющий экспрессию факторов ЭМП, таких, как ZEB1 [156]. Механизмы регуляции опухолевой прогрессии, контролируемые GRHL2, очень разнообразны и, очевидно, зависят от типа ткани. Более того, эффекты данного фактора транскрипции противоречивы: он может способствовать опухолевой прогрессии [157, 158] или выступать в качестве онкосупрессора [159, 160]. Широкомасштабное сравнительное исследование, проведенное на различных типах рака и образцах нормальной ткани, выявило сложные паттерны тканевой экспрессии GRHL2, свидетельствующие как об уменьшении, так и о повышении экспрессии в различных опухолях. Интересно, что повышение экспрессии наблюдали в пролиферирующих эпителиальных клетках с характеристиками стволовости (что подтверждается результатами изучения роли GRHL2 при раке поджелудочной железы [157], плоскоклеточного рака головы и шеи [161]), а также при неинвазивных типах рака [159]. Кроме того, повышенная экспрессия GRHL2 связана с увеличением пролиферативной активности, большими размерами опухолей и поздними клиническими стадиями колоректального рака.

GRHL2-отрицательный рак молочной железы встречается достаточно редко, но связан при этом с метастазированием в лимфатические узлы. В то же время сверхэкспрессия GRHL2 в клетках рака молочной железы стимулирует пролиферацию и ассоциирована с наиболее низким уровнем безрецидивной выживаемости [162, 163]. Сходный двойной эффект GRHL2 наблюдается при раке предстательной железы [164]. Рак почки и желудка характеризуется высокой частотой GRHL2-отрицательных опухолей [159]. В опухолях этого типа GRHL2 выступает в роли онкосупрессора и подавляет процессы инвазии и метастазирования [165, 166].

Интересна и мало изучена роль факторов репрограммирования в индукции МЭП и их влияние на опухолевую прогрессию. Показано, что в ходе получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из мышечных фибробластов путем сверхэкспрессии факторов репрограммирования Oct3/4, Klf4, c-Myc и Sox2 (OKMS) активируется эпителиальная программа, связанная с индукцией экспрессии miR-205/miR-200 и подавлением SNAIL1 и TGF- β 1/TGF- β R2, и клетки претерпевают МЭП [167, 168].

Результаты экспериментов по репрограммированию опухолевых клеток и влиянию репрограммирования на злокачественную прогрессию довольно противоречивы. С одной стороны, репрограммирование ведет к потере онкогенности [169, 170] и подавлению метастазирования [171–173], что, очевидно, связано с эффектом МЭП. С другой – экспрессия факторов репрограммирования ассоциирована с негативным прогнозом заболевания [172, 174–176]. Таким образом, индукция ЭМП с использованием факторов репрограммирования и рассмотрение этого подхода в качестве потенциальной противоопухолевой терапии требуют дальнейшего изучения и более глубокого понимания молекулярных механизмов связи плюрипотентности и клеточной пластичности.

Инициацию МЭП на этапе колонизации опухолевыми клетками сторонних тканей в ходе метастазирования связывают с изменением микроокружения, отсутствием внешних ЭМП-индуцирующих стимулов от опухоль-ассоциированной стромы, а также с изменением уровня оксигенации окружающей ткани [177–180].

ЭМП И УСТОЙЧИВОСТЬ К ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ, РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Химиотерапия

Процессы эпителиально-мезенхимального перехода при многих типах рака ассоциированы с негативным

прогнозом не только в связи с метастазированием. ЭМП – один из механизмов развития устойчивости к цитотоксическому действию противоопухолевых препаратов, главной проблемы современной онкологии. Более того, в то время как необходимость ЭМП для метастазирования рака поджелудочной и молочной железы подвергалась сомнению, как описано выше, его роль в формировании резистентности к химиотерапевтическим препаратам не вызывает разногласий [113, 114].

Сверхэкспрессия miR-93 вызывает индукцию ЭМП и снижение чувствительности клеток рака молочной железы к цитотоксическому действию доксорубина. Кроме того, экспрессия генов, связанных с множественной лекарственной устойчивостью, в клетках MCF-7, сверхэкспрессирующих miR-93, была значительно выше, чем в контроле. miR-93 взаимодействует с мРНК белка PTEN, известного регулятора ЭМП, в клетках рака молочной железы [69]. Другая микроРНК, подавляющая экспрессию PTEN – miR-21, также вовлечена в индукцию ЭМП и развитие резистентности клеток рака молочной железы к гемцитабину [181].

Регулятор транскрипции eIF4E обеспечивает индукцию экспрессии SNAIL1 и запуск ЭМП, ассоциированного с инвазией и резистентностью клеток назофарингеальной карциномы к цисплатину [182]. В клетках глиобластомы STAT3 активирует экспрессию SNAIL1, вызывая устойчивость опухоли к другому цитостатику – темозоломиду. Использование антител, блокирующих IL-6, препятствует активации STAT3 и экспрессии SNAIL1, что позволяет увеличивать чувствительность клеток глиобластомы к темозоломиду в комбинированной терапии [183].

Активация STAT3 за счет фосфорилирования по Y705 также ведет к индукции ЭМП и развитию толерантности клеток рака яичника к действию цисплатина. Активация процессов ЭМП, однако, связана с индукцией не SNAIL1, а другого транскрипционного фактора, важного для формирования мезенхимального фенотипа – Slug [184]. Кроме того, развитие резистентности к цисплатину связывают непосредственно со снижением аутофагии, вызванным активацией STAT3, но стоит отметить, что непосредственная роль активации Slug в этом процессе в данном исследовании не оценивали [184]. В то же время участие SNAIL1 и Slug в развитии резистентности рака яичников к химио- и радиотерапии подтверждается данными ряда публикаций [55, 185–188]. Повышенная активация Slug ассоциирована с устойчивостью к радиотерапии и эффективностью темозоломида у пациентов со злокачественной глиомой, в то время как при более низком уровне Slug повышается выживаемость пациентов без прогрес-

сирования заболевания [189]. Также показана роль Slug в развитии мультилекарственной резистентности в клеточной линии MCF-7 рака молочной железы. Slug индуцирует экспрессию металлопротеиназы MMP1, связываясь непосредственно с промоторной областью гена. Высокий уровень MMP1 ассоциирован с высоким уровнем прогрессии, метастазирования и негативным прогнозом у пациенток с раком молочной железы [190].

Онкосупрессор FBXW7, запускающий убиквитин-зависимую деградацию таких онкогенных факторов, как Myc, c-Jun, Cyclin E и Notch1, ответствен за деградацию SNAIL1 в клетках немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). Сверхэкспрессия FBXW7 подавляет прогрессию немелкоклеточного рака легкого путем задержки клеточного цикла, подавления ЭМП и увеличения чувствительности к химиотерапии. В образцах опухолей, полученных от пациентов с НМРЛ, снижена экспрессия FBXW7, причем это снижение коррелирует с более поздней стадией заболевания по классификации TNM и худшими показателями пятилетней выживаемости [191].

Наиболее изученным и одним из самых распространенных подходов к терапии рака является химиотерапия. Цитотоксический эффект химиотерапевтических препаратов (как и радиотерапии) распространяется преимущественно на быстроделющиеся клетки, так как молекулярный механизм их действия заключается в формировании повреждений ДНК, а также в нарушении образования митотического веретена. Таким образом, клетки с мезенхимальным фенотипом, имеющие более низкий индекс пролиферации, менее чувствительны к цитотоксическому действию химиотерапевтических препаратов в сравнении с эпителиальным фенотипом [75, 106, 192, 193]. Кроме того, недавние немногочисленные исследования выявили непосредственное влияние ЭМП на хорошо известные механизмы толерантности опухолевых клеток к массивному повреждению ДНК, связанные с репарацией ДНК [194–196], контролем клеточного цикла [197–199], инактивацией активных форм кислорода [200, 201] и аутофагией [202]. Таким образом, молекулярные механизмы резистентности к химиотерапевтическим средствам многообразны и при многих типах рака опосредованы запуском программы ЭМП, но эта взаимосвязь на сегодняшний день изучена недостаточно.

Таргетная противоопухолевая терапия

Представления о вкладе ЭМП в прогрессию опухолей значительно изменились с момента открытия этого процесса. На сегодняшний день очевидно, что ЭМП сводится не только к формированию мезенхимального фенотипа опухолевых клеток, способных к ин-

вазии и миграции. Участники ЭМП способны влиять непосредственно на пусковые онкогенные механизмы. Таргетная противоопухолевая терапия, в отличие от цитотоксической химиотерапии, направлена на конкретные молекулярные мишени – специфичные для конкретного типа рака белки, запускающие и способствующие росту опухолей. ЭМП лежит в основе устойчивости некоторых типов рака к действию таргетных препаратов. Наиболее подробно описана роль ЭМП в развитии устойчивости рака легкого к таргетной терапии.

По данным американского Института исследования рака (American Institute for Cancer Research, AICR), в 2018 году рак легкого стал самой распространенной в мире онкопатологией. Немелкоклеточный рак легкого составляет большую часть (около 85%) всех видов рака легкого. Активирующие мутации в гене *Egfr*, кодирующем рецептор эпидермального фактора роста, обнаруживают в 40–89% НМРЛ. Эти мутации приводят к повышению активности внутриклеточных сигнальных путей через аутофосфорилирование цитоплазматической части рецепторной тирозинкиназы EGFR, что ведет к индукции пролиферации клеток легочного эпителия, повышению ангиогенеза, инвазии и метастазированию [203]. Таргетная терапия, направленная на ингибирование активности EGFR, такими препаратами, как гефитиниб, эрлотиниб и афатиниб, лежит в основе лечения пациентов с активирующими мутациями *Egfr*. Однако, как и в случае химиотерапии, основной проблемой остается долгосрочная эффективность данных препаратов, которую ограничивают исходная и приобретенная устойчивость опухоли к действию ингибитора. Предпринимаются попытки преодоления устойчивости, в том числе связанные с подавлением механизмов ЭМП.

Сверхэкспрессия TWIST1, одного из ключевых транскрипционных факторов ЭМП, вызывает резистентность *Egfr*-мутантных клеток НМРЛ к действию ингибиторов EGFR – эрлотиниба и озимертиниба [204]. Озимертиниб – ингибитор EGFR третьего поколения, одобренный в 2017 году к применению при НМРЛ со специфической мутацией EGFR T790M, существующей *de novo* или приобретенной в ходе лечения препаратами первой линии: гефитинибом, эрлотинибом или афатинибом, ассоциированной с резистентностью к этим препаратам. Однако резистентность к противоопухолевому действию озимертиниба возникает в течение примерно 10 месяцев и ассоциирована с мутацией C797S в экзоне 20 *Egfr*. Важно отметить, что в настоящее время не существует одобренного средства, эффективного при НМРЛ с мутацией в *Egfr*, который прогресси-

рует после развития устойчивости к озимертинибу. Подавление активности TWIST1 в клетках НМРЛ, устойчивых к действию эрлотиниба и озимертиниба, дозозависимо повышало их чувствительность к цитотоксическому действию ингибиторов EGFR. Причем механизм сенситизации связан с тем, что TWIST1 подавляет транскрипцию проапоптотического BCL2L1 (BIM), связываясь с промоторной областью гена [204].

Помимо этого, клеточные линии НМРЛ, устойчивые к эрлотинибу, имеют мезенхимальный фенотип (снижение экспрессии E-кадгерина и индукция виментина и N-кадгерина), в них активированы не только TWIST1, но и SNAIL1, Slug и ZEB1. Причем преодоление устойчивости к эрлотинибу при помощи фураמידина, ингибитора PRMT-1, связано с подавлением ЭМП и восстановлением эпителиальных характеристик [205]. Роль ЭМП в развитии резистентности к гефитинибу и отмена резистентности в результате МЭП подтверждены в ряде исследований [206, 207].

НМРЛ (в 3–7% случаев) ассоциирован с различными транслокациями гена *Alk*, ведущими к образованию более 19 химерных белков, включая EML4, KIF5B, KLC1 и TPR. Однако независимо от разнообразия партнеров, вовлеченных в транслокацию, все химерные продукты сохраняют киназный домен ALK, ответственный за конститутивную онкогенную активацию сигнальных путей ALK (в числе которых сигнальные пути Ras/Raf/MEK/ERK1/2, JAK/STAT, PI3K/Akt, PLC- γ), регулирующих процессы миграции, пролиферации и выживаемости клеток [208]. Большинство химерных ALK чувствительны к ингибитору кризотинибу, высоко эффективному при подобных формах НМРЛ. Однако резистентность к кризотинибу развивается у большинства пациентов в течение нескольких лет.

В некоторых линиях НМРЛ (H2228 и DFCI032, но не H3122) с онкогенной активацией ALK обнаружен низкий уровень E-кадгерина и высокий уровень виментина и других мезенхимальных маркеров, причем ингибирование ALK приводит к смене фенотипа клеток на эпителиальный [209]. В то же время Nakamichi и соавт. [210] получили линии H2228, резистентные к трем различным ингибиторам ALK (кризотинибу, алектинибу и серитинибу). В этих линиях выявлено снижение экспрессии ALK и сверхэкспрессия другого онкогенного белка – AXL, признаки ЭМП и стволовых клеток. При этом искусственная индукция ЭМП с использованием TGF- β 1 ассоциирована также с увеличением экспрессии AXL, а ингибитор AXL позволял сенситизировать резистентные клетки к противоопухолевому действию ингибиторов ALK [210]. Таким образом, активацию AXL можно рассматривать как механизм, лежащий в основе опу-

холевой резистентности к ингибиторам ALK, а также индукции ЭМП в условиях низкой активности ALK. При этом причиной развития резистентности является именно ЭМП. Подавление ЭМП не только на уровне AXL, но и при использовании ингибиторов HDAC позволяет преодолеть устойчивость клеток НМРЛ с мутантным ALK [211]. Активацию AXL и ЭМП при раке почки вызывает также длительное применение сунитиниба [212].

Последние исследования показывают, что ЭМП, связанный с метилированием гена E-кадгерина, лежит в основе устойчивости к гормональной терапии тамоксифеном при эстроген-положительном раке молочной железы [213], а при HER2-положительной форме заболевания ЭМП играет ключевую роль в развитии устойчивости к таргетному препарату трастузумабу [214, 215].

Иммунотерапия

Противоопухолевая иммунотерапия направлена на активацию иммунных клеток для распознавания и индукции цитотоксичности в отношении клеток опухоли. Ингибиторы так называемых иммунологических чекпойнтов (а именно, ингибиторы CTLA4, PD-1 и PD-L1) считаются одним из главных и наиболее успешных направлений иммунотерапии рака. В 2018 году J.P. Allison и Т. Honjo были удостоены Нобелевской премии в области медицины и физиологии за открытие этого подхода и молекулярных механизмов, лежащих в его основе.

CTLA4 экспрессируется на поверхности активированных Т-клеток (а также на поверхности Т-регуляторных клеток (Treg)) и взаимодействует с молекулами CD80 и CD86 на поверхности антигенпредставляющих клеток. В отличие от гомологичной костимуляторной молекулы CD28 (которая также связывается с CD80 и CD86), CTLA4 является коингибитором сигнального ответа Т-клеточного рецептора и подавляет иммунный ответ, поддерживая баланс и предотвращая развитие аутоиммунных процессов [216]. Allison и соавт. впервые показали, что использование антител, блокирующих CTLA4, позволяет усилить иммунный ответ против опухоли и вызывает ее отторжение *in vivo* [217]. Мембранный белок PD-1, как и CTLA4, подавляет иммунный ответ. PD-1, экспрессирующийся на поверхности Т-лимфоцитов, взаимодействует с молекулами PD-L1, PD-L2, в норме локализованными на поверхности антигенпредставляющих клеток. Кроме того, опухолевые клетки используют экспрессию PD-L1 на своей поверхности, чтобы скрыться от иммунного ответа [218, 219]. Honjo и соавт. показали, что ингибирование PD-1 активирует противоопухолевый иммунный ответ независимо от PD-L1/PD-L2-статуса опухоли, вызывая при этом

более мягкий аутоиммунный эффект по сравнению с ингибированием CTLA4 [220].

На сегодняшний день одобрено применение различных ингибиторов CTLA4, PD-1, PD-L1 и их комбинации в терапии меланомы, рака почки, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака головы и шеи, уротелиальной карциномы, колоректального рака и лимфомы Ходжкина. Причем эти ингибиторы используются в качестве адъювантной терапии или же в качестве терапии второй и третьей линии, когда применение химиотерапии и таргетных противоопухолевых препаратов становится неэффективным из-за развития резистентности. Исключение представляет метастатическая форма немелкоклеточного рака легкого с высоким уровнем экспрессии PD-L1, *Egfr* и *Alk* дикого типа, при которой показана комбинированная терапия ипилимумабом и ниволумабом (ингибиторы CTLA4 и PD-1 соответственно) в качестве препаратов первой линии [221]. Таким образом, на сегодняшний день иммунотерапия – это последняя терапевтическая опция при неэффективности химио- и таргетной терапии для многих пациентов с онкологическими заболеваниями.

Обнаружено, что ЭМП ассоциирован с повышенной экспрессией PD-L1 [222–227], а также ингибиторного поверхностного белка CD47, блокирующего фагоцитоз [228] в клетках опухоли, скрывая их от иммунологического надзора, в частности, во время инвазии и миграции во вторичные органы с образованием метастазов. Более того, при немелкоклеточном раке легкого ЭМП ассоциирован со снижением инфильтрации CD4/CD8 Т-лимфоцитами, играющими ключевую роль в противоопухолевом иммунном ответе [229], и повышенным содержанием CD4/Foxp3 Т-регуляторных лимфоцитов, подавляющих иммунный ответ [230]. Также экспрессия маркеров ЭМП в тканях НМРЛ ассоциирована с повышенной экспрессией иммунологических чекпойнтов PD-L1, PD-L2, PD-1, TIM-3, B7-H3, VTLA, CTLA4 [230] и экспрессией иммуносупрессорных цитокинов, таких, как IL-10 и TGF- β , однако молекулярные механизмы этого неясны [229].

Опухоли с высоким уровнем инфильтрации Т-лимфоцитов, очевидно, должны быть более чувствительными к ингибиторам PD-1/PD-L1, однако большое количество пациентов с подобными опухолями не отвечают на терапию. Используя данные, представленные в базе экспрессионных профилей опухолей (The Cancer Genome Atlas (TCGA)), Wang и соавт. обнаружили в уротелиальных опухолях положительную корреляцию между экспрессией маркеров ЭМП и уровнем инфильтрации Т-лимфоцитами. Однако высокий уровень экспрес-

сии маркеров ЭМП в уротелиальных опухолях с высоким уровнем инфильтрации Т-лимфоцитами связан с плохим ответом на терапию ниволумабом (ингибитор PD-1) и более низкой выживаемостью. Интересно, что источником повышенной экспрессии маркеров ЭМП выступают при этом клетки опухолевой стромы [231].

Таким образом, развитие устойчивости опухолей к терапии ингибиторами иммунологических чекпойнтов на сегодняшний день изучено недостаточно. Предполагается возможность утилизации механизмов ЭМП в этом процессе, однако необходимо дальнейшее изучение тонких молекулярных механизмов ЭМП.

Стволовые опухолевые клетки

На данный момент классическая концепция, объясняющая развитие устойчивости к противоопухолевой терапии, основана на так называемых стволовых опухолевых клетках (СОК). СОК экспрессируют маркеры, характерные для нормальных стволовых клеток, например, CD44, CD133, CD34 и ЕрСАМ. За счет множества различных механизмов СОК устойчивы к действию химио- и радиотерапии [232–234] (в отличие от основной массы дифференцированных опухолевых клеток, которые подвергаются апоптозу в случае эффективной терапии), миграции (многочисленные данные свидетельствуют о роли СОК в метастазировании [235]), а также, что наиболее важно, к последующему делению и дифференцировке в различные линии опухолевых клеток, что обеспечивает гетерогенность рецидивирующей опухоли и возникновение клонов, устойчивых к терапии [236].

Существует ли связь между ЭМП и СОК, объясняющая столь выраженное сходство в их влиянии на опухолевую прогрессию? Несмотря на то что СОК несомненно обладают характеристиками, присущими нормальным стволовым клеткам, на сегодняшний день нет однозначного понимания их происхождения. Это связано со сложностью идентификации маркеров стволовости, которые могут различаться в опухолях разных типов. По-видимому, по этой же причине СОК идентифицированы не во всех типах рака [237].

Существует несколько теорий о возможных источниках возникновения СОК. Первая предполагает образование СОК из стволовых клеток в составе зрелой ткани, обеспечивающих ее обновление в результате соматических мутаций. Показано, что СОК, инициирующие острый миелоидный лейкоз, не только способны к дифференцировке во все типы клеток крови, но и сохраняют потенциал к самообновлению и восстановлению гемопоэза в серии трансплантаций облученным мышам, что считается главной характеристикой гемопоэтических стволовых клеток. Это дает

основания предполагать, что в данном случае СОК возникают именно из гемопоэтических стволовых клеток в результате мутаций, что позволяет опухолевой клетке утилизировать «стволовые» регуляторные сигнальные пути для продвижения опухолевой прогрессии [238].

Вторая теория предполагает образование СОК из дифференцированных клеток путем их дедифференцировки и обретения некоторых характеристик стволовых клеток. Это предположение связано с пониманием клеточной пластичности и возможностью перепрограммирования соматических клеток в плюрипотентные стволовые [239]. Более того, недавно на линиях клеток рака предстательной железы показано, что такое перепрограммирование возможно и может быть индуцировано терапевтическим вмешательством и развитием резистентности к нему [240].

Специфические молекулярные механизмы, лежащие в основе перепрограммирования опухолевых клеток в СОК, еще недостаточно изучены, но есть основания полагать, что они связаны с ЭМП. Активация ЭМП путем эктопической экспрессии SNAIL1 или TWIST, а также путем активации TGF- β 1 в линии клеток рака молочной железы связана с индукцией экспрессии маркеров стволовости (появление CD44⁺/CD24⁻ клеток) и повышением их способности к образованию мамосфер – опухолеподобных структур, каждая из которых представляет собой клон единичной СОК [241]. Более того, активация ЭМП через сигнальный путь Ras-МАРК в нормальных CD44⁻/CD24⁺ клетках молочной железы приводит к их трансформации в CD44⁺/CD24⁻ стволовые опухолевые клетки, а дополнительная активация TGF- β 1 усиливает этот эффект [242]. Примечательно, что в недавнем исследовании на трансгенных мышах – моделях рака молочной железы MMTV-РyMT, показано, что СОК и нормальные стволовые клетки молочной железы, несмотря на схожесть фенотипа, не только формируются в разных участках эпителия молочной железы (люминальная и базальная области соответственно), но и обладают отличиями в молекулярных механизмах активации ЭМП, задействуя транскрипционные факторы SNAIL1 и Slug соответственно. Данное исследование поддерживает теорию образования СОК из дифференцированных клеток путем их репрограммирования в ходе ЭМП [125]. Участие ЭМП в формировании СОК и связанные с данными процессами устойчивость к противоопухолевой терапии и метастатическая прогрессия показаны также для рака поджелудочной железы [243, 244], предстательной железы [245], плоскоклеточного рака головы и шеи [158, 246, 247], рака желудка [248, 249], мелано-

мы [250], глиобластомы [251] и колоректального рака [252, 253].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ЭМП – МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

В обзоре рассмотрена роль механизмов ЭМП в опухолевой прогрессии, а также экспериментальные и клинические данные, подтверждающие вовлечение ЭМП практически во все аспекты прогрессии: инвазию и метастазирование, устойчивость к цитотоксической и таргетной терапии, уход от иммунного надзора. Наиболее важен, на наш взгляд, потенциальный вклад ЭМП в возникновение СОК. Согласно современным представлениям СОК являются основой гетерогенности опухоли, представляющей главную сложность для терапии онкопатологии, а также ключевым фактором рецидива заболевания. Таким образом, участники сигнальных путей и транскрипционные факторы, активирующие ЭМП, считаются перспективными молекулярными мишенями для противоопухолевой терапии. Как правило, это ингибиторы ключевых компонентов онкогенных сигнальных путей, регулирующих не только ЭМП, но и пролиферацию, рост, выживаемость и ангиогенез. Причем терапевтическая эффективность ингибирования конкретного белка, связанного с ЭМП, зависит от типа опухоли, поскольку, как обсуждалось выше, в комплексе регуляции ЭМП в ходе опухолевой прогрессии (в зависимости от типа ткани) могут использоваться разные сигнальные пути.

Одобрено клиническое применение ряда препаратов, используемых в комбинированной терапии опухолей (в сочетании с ингибиторами тирозинкиназ или химио- и радиотерапией), в виде монотерапии, если отсутствуют иные терапевтические опции,

а также в качестве препаратов второй и третьей линии терапии при развитии устойчивости (таблица).

В настоящее время проходят клинические испытания ряда ингибиторов (преимущественно комбинированные схемы). Завершены клинические испытания (фаза 1) ингибитора TGF-βRI (Galunisertib) в комбинации с ингибитором PD-L1 (Durvalumab) при метастатическом раке поджелудочной железы (NCT02734160), а также в качестве монотерапии у пациентов с поздней стадией заболевания и распространением опухоли в другие части тела (NCT02154646), а также в сочетании с гемцитабином при неоперабельной метастатической форме заболевания (фазы 1, 2 испытаний) (NCT01373164). Опубликованные данные последнего исследования подтверждают преимущества комбинированной терапии по сравнению с химиотерапией гемцитабином. Кроме того, анализ опухолевых образцов, полученных от пациентов, позволил выявить потенциальные предиктивные маркеры чувствительности к терапии [254]. Помимо этого, Galunisertib прошел испытания фаз 2 и 3 на пациентах с миелодиспластическим синдромом разной степени тяжести (NCT02008318). Эта терапия имела приемлемый профиль безопасности и приводила к улучшению гематологических показателей у пациентов с низкой и средней степенью риска трансформации в острый лейкоз и к положительному ответу у пациентов с признаками раннего блока дифференцировки стволовых клеток [255]. Проведены клинические испытания Galunisertib в различных терапевтических схемах при ряде опухолей (clinicaltrials.gov).

Моноклональное антитело Fresolimumab, связывающее все изоформы трансформирующего фактора роста TGF-β, в комбинации с радиотерапией прошло клинические испытания (фаза 2)

Противоопухолевые препараты, подавляющие различные компоненты сигнальных путей ЭМП

Препарат	Мишень	Фаза клинических испытаний	Заболевание
Vismodegib	Smoothened (Shh-сигнальный путь)	Одобрен	Метастатическая, неоперабельная, устойчивая к радиотерапии форма базально-клеточного рака
Temsirolimus и Everolimus	mTOR (сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR)	Одобрен	Рак почки, рецидив лимфомы, устойчивой к другим видам терапии, хронический лимфоцитарный лейкоз
Galunisertib	TGF-βRI	Фаза 1 Фазы 2, 3	Метастатическая форма рака поджелудочной железы, миелодиспластический синдром
Fresolimumab	TGF-β	Фаза 2	Метастатическая форма рака молочной железы, меланома, рак почки, злокачественная плевральная мезотелиома, немелкоклеточный рак легкого
Tarextumab	Notch	Фаза 1b/2	Рак поджелудочной железы, IV стадия
Vantictumab	Frizzled	Фаза 1	Рак поджелудочной железы, IV стадия, НМРЛ, метастатическая форма рака молочной железы
Harmine	TWIST1	Доклинические испытания	НМРЛ

на выборке пациенток с метастатической формой рака молочной железы (NCT01401062). Выявлены молекулярные маркеры чувствительности к терапии Fresolimumab [256], показана перспективность использования этого антитела в комбинации с блокадой PD-1 для усиления эффективности терапии [257]. Кроме того, Fresolimumab проходит испытания в качестве препарата против меланомы и рака почки (NCT00356460), злокачественной плевральной мезотелиомы (NCT01112293) и немелкоклеточного рака легкого в сочетании с радиотерапией (NCT02581787).

Ингибитор Notch Tarextumab, успешно прошедший доклинические испытания, оказался не эффективным в фазе 1b/2 рандомизированных клинических испытаний в составе комбинированной терапии (в сочетании с эпозидом и препаратами платины) мелкоклеточного рака легкого (NCT01859741). В комбинации с набпаклитакселом и гемцитабином препарат испытан также у пациентов с IV стадией рака поджелудочной железы, ранее не получавших терапию (NCT01647828). В подобной схеме участвует также ингибитор Frizzled Vantictumab (NCT02005315). Кроме того, Vantictumab прошел испытания первой фазы в терапии НМРЛ (NCT01957007) и метастатической формы рака молочной железы (NCT01973309).

Ингибитор TWIST1 – алкалоид Harmine, вызывающий деградацию гомодимеров TWIST1 и гетеродимеров TWIST1-E2A, на данный момент находится на доклиническом этапе исследований. Сам Harmine оказывает цитотоксический эффект на клеточные

линии НМРЛ с мутациями в гене *Egfr*, *Kras* и *c-Met*. Также он эффективен в моделях *in vivo* как в трансгенных мышцах с мутацией *Kras*, так и в ксенографтных моделях, полученных из опухолевой ткани пациентов (PDX – patient derived xenograft) [258]. Таким образом, Harmine является перспективным таргетным противоопухолевым препаратом как для монотерапии НМРЛ, так и в качестве препарата третьей линии при резистентности к ингибиторам EGFR, что считается более вероятной схемой введения препарата в клинические испытания.

Таким образом, молекулярные механизмы регуляции ЭМП представляют интерес для исследований в области противоопухолевой терапии. Знание механизмов ЭМП важно как для создания новых лекарственных средств, так и для совершенствования уже существующей терапии. Фармакологическое подавление ЭМП может способствовать не только ограничению процессов метастазирования и преодолению резистентности к существующей терапии, но также поможет подавить источник опухолевого рецидива – СОК. В некоторых случаях, когда другие типы терапии неэффективны, препараты, ингибирующие ЭМП, являются единственной терапевтической опцией. ●

Обзорное исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда
(проект № 18-75-10054).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nollet F., Kools P., van Roy F. // J. Mol. Biol. 2000. V. 299. № 3. P. 551–572.
- Yamada S., Pokutta S., Drees F., Weis W.I., Nelson W.J. // Cell. 2005. V. 123. № 5. P. 889–901.
- Ishiyama N., Lee S.H., Liu S., Li G.Y., Smith M.J., Reichardt L.F., Ikura M. // Cell. 2010. V. 141. № 1. P. 117–128.
- Drees F., Pokutta S., Yamada S., Nelson W.J., Weis W.I. // Cell. 2005. V. 123. № 5. P. 903–915.
- Perez-Moreno M., Fuchs E. // Dev. Cell. 2006. V. 11. № 5. P. 601–612.
- Shamir E.R., Ewald A.J. // Curr. Top. Dev. Biol. 2015. V. 112. P. 353–382.
- Cukierman E., Pankov R., Stevens D.R., Yamada K.M. // Science. 2001. V. 294. № 5547. P. 1708–1712.
- Pankov R., Cukierman E., Katz B.Z., Matsumoto K., Lin D.C., Lin S., Hahn C., Yamada K.M. // J. Cell. Biol. 2000. V. 148. № 5. P. 1075–1090.
- Greenburg G., Hay E.D. // J. Cell. Biol. 1982. V. 95. № 1. P. 333–339.
- Hay E.D. // Acta Anat. (Basel). 1995. V. 154. № 1. P. 8–20.
- Thiery J.P., Sleeman J.P. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2006. V. 7. № 2. P. 131–142.
- Maschler S., Wirl G., Spring H., Bredow D.V., Sordat I., Beug H., Reichmann E. // Oncogene. 2005. V. 24. № 12. P. 2032–2041.
- Takenawa T., Suetsugu S. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2007. V. 8. № 1. P. 37–48.
- Kimelman D. // Nat. Rev. Genet. 2006. V. 7. № 5. P. 360–372.
- Viebahn C. // Acta Anat. (Basel). 1995. V. 154. № 1. P. 79–97.
- Correia A.C., Costa M., Moraes F., Bom J., Novoa A., Mallo M. // Dev. Dyn. 2007. V. 236. № 9. P. 2493–2501.
- Markwald R.R., Fitzharris T.P., Manasek F.J. // Am. J. Anat. 1977. V. 148. № 1. P. 85–119.
- Person A.D., Klewer S.E., Runyan R.B. // Int. Rev. Cytol. 2005. V. 243. № 1. P. 287–335.
- Fitchett J.E., Hay E.D. // Dev. Biol. 1989. V. 131. № 2. P. 455–474.
- Hudson L.G., Newkirk K.M., Chandler H.L., Choi C., Fossey S.L., Parent A.E., Kusewitt D.F. // J. Dermatol. Sci. 2009. V. 56. № 1. P. 19–26.
- Eming S.A., Martin P., Tomic-Canic M. // Sci. Transl. Med. 2014. V. 6. № 265. P. 265sr6.
- Liu Y. // Nat. Rev. Nephrol. 2011. V. 7. № 12. P. 684–696.
- Higgins D.F., Kimura K., Bernhardt W.M., Shrimanker N., Akai Y., Hohenstein B., Saito Y., Johnson R.S., Kretzler M., Cohen C.D., et al. // J. Clin. Invest. 2007. V. 117. № 12. P. 3810–3820.
- Zeisberg M., Hanai J., Sugimoto H., Mammoto T., Charytan D., Strutz F., Kalluri R. // Nat. Med. 2003. V. 9. № 7. P. 964–968.
- Zhou G., Dada L.A., Wu M., Kelly A., Trejo H., Zhou Q., Varga J., Sznajder J.I. // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2009. V. 297. № 6. P. L1120–L1130.
- Gressner A.M., Weiskirchen R. // J. Cell. Mol. Med. 2006. V. 10. № 1. P. 76–99.

27. Yamakoshi S., Bai R., Chaen T., Ideta A., Aoyagi Y., Sakurai T., Konno T., Imakawa K. // *Reproduction*. 2012. V. 143. № 3. P. 377–387.
28. Uchida H., Maruyama T., Nishikawa-Uchida S., Oda H., Miyazaki K., Yamasaki A., Yoshimura Y. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 7. P. 4441–4450.
29. Saunders L.R., McClay D.R. // *Development*. 2014. V. 141. № 7. P. 1503–1513.
30. Carver E.A., Jiang R., Lan Y., Oram K.F., Gridley T. // *Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 21. № 23. P. 8184–8188.
31. Lim J., Thiery J.P. // *Development*. 2012. V. 139. № 19. P. 3471–3486.
32. Duband J.L., Monier F., Delannet M., Newgreen D. // *Acta Anat. (Basel)*. 1995. V. 154. № 1. P. 63–78.
33. Duband J.L., Dady A., Fleury V. // *Curr. Top Dev. Biol.* 2015. V. 111. P. 27–67.
34. Poelmann R.E., Gittenberger-de Groot A.C., Mentink M.M., Delpech B., Girard N., Christ B. // *Anat. Embryol (Berl.)*. 1990. V. 182. № 1. P. 29–39.
35. Azhar M., Schultz J., Grupp I., Dorn G.W., 2nd., Meneton P., Molin D.G., Gittenberger-de Groot A.C., Doetschman T. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003. V. 14. № 5. P. 391–407.
36. Hernandez L., Ryckebusch L., Wang C., Ling R., Yelon D. // *Dev. Dyn.* 2019. V. 248. № 12. P. 1195–1210.
37. Jalali A., Zhu X., Liu C., Nawshad A. // *Dev. Growth Differ.* 2012. V. 54. № 6. P. 633–648.
38. Volk S.W., Iqbal S.A., Bayat A. // *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. 2013. V. 2. № 6. P. 261–272.
39. Yan C., Grimm W.A., Garner W.L., Qin L., Travis T., Tan N., Han Y.P. // *Am. J. Pathol.* 2010. V. 176. № 5. P. 2247–2258.
40. Hinz B., Gabbiani G. // *Thromb. Haemost.* 2003. V. 90. № 6. P. 993–1002.
41. Abe R., Donnelly S.C., Peng T., Bucala R., Metz C.N. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. № 12. P. 7556–7562.
42. Higashiyama R., Nakao S., Shibusawa Y., Ishikawa O., Moro T., Mikami K., Fukumitsu H., Ueda Y., Minakawa K., Tabata Y., et al. // *J. Invest. Dermatol.* 2011. V. 131. № 2. P. 529–536.
43. Frid M.G., Kale V.A., Stenmark K.R. // *Circ. Res.* 2002. V. 90. № 11. P. 1189–1196.
44. Gabbiani G. // *J. Pathol.* 2003. V. 200. № 4. P. 500–503.
45. Border W.A., Noble N.A. // *N. Engl. J. Med.* 1994. V. 331. № 19. P. 1286–1292.
46. Hong K.M., Belperio J.A., Keane M.P., Burdick M.D., Strieter R.M. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 31. P. 22910–22920.
47. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H., Tomic-Canic M. // *Wound Repair Regen.* 2008. V. 16. № 5. P. 585–601.
48. Savagner P., Kusewitt D.F., Carver E.A., Magnino F., Choi C., Gridley T., Hudson L.G. // *J. Cell Physiol.* 2005. V. 202. № 3. P. 858–866.
49. Hanahan D., Weinberg R.A. // *Cell*. 2011. V. 144. № 5. P. 646–674.
50. Vincent-Salomon A., Thiery J.P. // *Breast Cancer Res.* 2003. V. 5. № 2. P. 101–106.
51. Brabletz T., Jung A., Reu S., Porzner M., Hlubek F., Kunz-Schughart L.A., Knuechel R., Kirchner T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 18. P. 10356–10361.
52. Milano A., Mazzetta F., Valente S., Ranieri D., Leone L., Botticelli A., Onesti C.E., Lauro S., Raffa S., Torrioni M.R., et al. // *Anal. Cell. Pathol. (Amst.)*. 2018. V. 2018. P. 3506874.
53. Giannoni E., Bianchini F., Masieri L., Serni S., Torre E., Calorini L., Chiarugi P. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 17. P. 6945–6956.
54. Li Q.Q., Xu J.D., Wang W.J., Cao X.X., Chen Q., Tang F., Chen Z.Q., Liu X.P., Xu Z.D. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. № 8. P. 2657–2665.
55. Kurrey N.K., Jalgaonkar S.P., Joglekar A.V., Ghanate A.D., Chaskar P.D., Doiphode R.Y., Bapat S.A. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. № 9. P. 2059–2068.
56. Kudo-Saito C., Shirako H., Takeuchi T., Kawakami Y. // *Cancer Cell*. 2009. V. 15. № 3. P. 195–206.
57. Ansieau S., Bastid J., Doreau A., Morel A.P., Bouchet B.P., Thomas C., Fauvet F., Puisieux I., Doglioni C., Piccinin S., et al. // *Cancer Cell*. 2008. V. 14. № 1. P. 79–89.
58. Vega S., Morales A.V., Ocana O.H., Valdes F., Fabregat I., Nieto M.A. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. № 10. P. 1131–1143.
59. Terry S., Savagner P., Ortiz-Cuaran S., Mahjoubi L., Saintigny P., Thiery J.P., Chouaib S. // *Mol. Oncol.* 2017. V. 11. № 7. P. 824–846.
60. Tarin D., Thompson E.W., Newgreen D.F. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 14. P. 5996–6000.
61. Goossens S., Vandamme N., van Vlierberghe P., Berx G. // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. 2017. V. 1868. № 2. P. 584–591.
62. Wu W.S., You R.I., Cheng C.C., Lee M.C., Lin T.Y., Hu C.T. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 17753.
63. Aghdassi A., Sandler M., Guenther A., Mayerle J., Behn C.O., Heidecke C.D., Friess H., Buchler M., Evert M., Lerch M.M., et al. // *Gut*. 2012. V. 61. № 3. P. 439–448.
64. Krebs A.M., Mitschke J., Lasierra Losada M., Schmalhofer O., Boerries M., Busch H., Boettcher M., Mougiakakos D., Reichardt W., Bronsert P., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2017. V. 19. № 5. P. 518–529.
65. Mody H.R., Hung S.W., Pathak R.K., Griffin J., Cruz-Monserrate Z., Govindarajan R. // *Mol. Cancer Res.* 2017. V. 15. № 8. P. 1029–1039.
66. Rodgers J.J., McClure R., Epis M.R., Cohen R.J., Leedman P.J., Harvey J.M., Australian Prostate Cancer B., Thomas M.A., Bentel J.M. // *J. Cell Biochem.* 2019. V. 120. № 1. P. 848–860.
67. Sagredo A.I., Sagredo E.A., Pola V., Echeverria C., Andaur R., Michea L., Stutzin A., Simon F., Marcelain K., Armisen R. // *J. Cell. Physiol.* 2019. V. 234. № 3. P. 2037–2050.
68. Yin S., Cheryan V.T., Xu L., Rishi A.K., Reddy K.B. // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 8. P. e0183578.
69. Chu S., Liu G., Xia P., Chen G., Shi F., Yi T., Zhou H. // *Oncol. Rep.* 2017. V. 38. № 4. P. 2401–2407.
70. Zou G., Ren B., Liu Y., Fu Y., Chen P., Li X., Luo S., He J., Gao G., Zeng Z., et al. // *Cancer Sci.* 2018. V. 109. № 11. P. 3416–3427.
71. Li H., Zhong A., Li S., Meng X., Wang X., Xu F., Lai M. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 4915.
72. Wu Y., Zhou B.P. // *Br. J. Cancer*. 2010. V. 102. № 4. P. 639–644.
73. Wang D., Shi W., Tang Y., Liu Y., He K., Hu Y., Li J., Yang Y., Song J. // *Oncogene*. 2017. V. 36. № 7. P. 885–898.
74. Yang S., Liu Y., Li M.Y., Ng C.S.H., Yang S.L., Wang S., Zou C., Dong Y., Du J., Long X., et al. // *Mol. Cancer*. 2017. V. 16. № 1. P. 124.
75. Beck T.N., Korobeynikov V.A., Kudinov A.E., Georgopoulos R., Solanki N.R., Andrews-Hoke M., Kistner T.M., Pepin D., Donahoe P.K., Nicolas E., et al. // *Cell. Rep.* 2016. V. 16. № 3. P. 657–671.
76. Cruz S.M., Balkwill F.R. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2015. V. 12. № 10. P. 584–596.
77. Suarez-Carmona M., Lesage J., Cataldo D., Gilles C. // *Mol. Oncol.* 2017. V. 11. № 7. P. 805–823.
78. Daly C.S., Flemban A., Shafei M., Conway M.E., Qualtrough D., Dean S.J. // *Oncol. Rep.* 2018. V. 39. № 2. P. 483–490.
79. Xu F., Zhang J., Hu G., Liu L., Liang W. // *Cancer Cell Int.* 2017. V. 17. P. 54.
80. Joseph J.P., Harishankar M.K., Pillai A.A., Devi A. // *Oral*

- Oncol. 2018. V. 80. P. 23–32.
81. Zuo J, Wen J, Lei M, Wen M, Li S, Lv X, Luo Z, Wen G. // *Med. Oncol.* 2016. V. 33. № 2. P. 15.
82. Domogatskaya A., Rodin S., Tryggvason K. // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2012. V. 28. P. 523–553.
83. Horejs C.M., Serio A., Purvis A., Gormley A.J., Bertazzo S., Poliniewicz A., Wang A.J., DiMaggio P., Hohenester E., Stevens M.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 16. P. 5908–5913.
84. Chen Q.K., Lee K., Radisky D.C., Nelson C.M. // *Differentiation.* 2013. V. 86. № 3. P. 126–132.
85. Horejs C.M., St-Pierre J.P., Ojala J.R.M., Steele J.A.M., da Silva P.B., Rynne-Vidal A., Maynard S.A., Hansel C.S., Rodriguez-Fernandez C., Mazo M.M., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. № 1. P. 15509.
86. Qin Y., Rodin S., Simonson O.E., Hollande F. // *Semin. Cancer Biol.* 2017. V. 45. № 1. P. 3–12.
87. Carpenter P.M., Sivadas P., Hua S.S., Xiao C., Gutierrez A.B., Ngo T., Gershon P.D. // *Cancer Med.* 2017. V. 6. № 1. P. 220–234.
88. Ishikawa T., Wondimu Z., Oikawa Y., Gentilcore G., Kiessling R., Egyhazi Brage S., Hansson J., Patarroyo M. // *Matrix Biol.* 2014. V. 38. P. 69–83.
89. Oikawa Y., Hansson J., Sasaki T., Rousselle P., Domogatskaya A., Rodin S., Tryggvason K., Patarroyo M. // *Exp. Cell. Res.* 2011. V. 317. № 8. P. 1119–1133.
90. Akhavan A., Griffith O.L., Soroceanu L., Leonoudakis D., Luciani-Torres M.G., Daemen A., Gray J.W., Muschler J.L. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 10. P. 2578–2588.
91. Spaderna S., Schmalhofer O., Hlubek F., Berx G., Eger A., Merkel S., Jung A., Kirchner T., Brabletz T. // *Gastroenterology.* 2006. V. 131. № 3. P. 830–840.
92. Takkunen M., Ainola M., Vainionpaa N., Grenman R., Patarroyo M., Garcia de Herreros A., Kontinen Y.T., Virtanen I. // *Histochem. Cell. Biol.* 2008. V. 130. № 3. P. 509–525.
93. Pyke C., Romer J., Kallunki P., Lund L.R., Ralfkiaer E., Dano K., Tryggvason K. // *Am. J. Pathol.* 1994. V. 145. № 4. P. 782–791.
94. Koshikawa N., Moriyama K., Takamura H., Mizushima H., Nagashima Y., Yanoma S., Miyazaki K. // *Cancer Res.* 1999. V. 59. № 21. P. 5596–5601.
95. Giannelli G., Bergamini C., Fransvea E., Sgarra C., Antonaci S. // *Gastroenterology.* 2005. V. 129. № 5. P. 1375–1383.
96. Peng D.H., Ungewiss C., Tong P., Byers L.A., Wang J., Canales J.R., Villalobos P.A., Uraoka N., Mino B., Behrens C., et al. // *Oncogene.* 2017. V. 36. № 14. P. 1925–1938.
97. Brooks M., Mo Q., Krasnow R., Ho P.L., Lee Y.C., Xiao J., Kurtova A., Lerner S., Godoy G., Jian W., et al. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 50. P. 82609–82619.
98. Ezzoukhry Z., Henriët E., Piquet L., Boye K., Bioulac-Sage P., Balabaud C., Couchy G., Zucman-Rossi J., Moreau V., Saltel F. // *Eur. J. Cell. Biol.* 2016. V. 95. № 11. P. 503–512.
99. Wei S.C., Fattet L., Tsai J.H., Guo Y., Pai V.H., Majeski H.E., Chen A.C., Sah R.L., Taylor S.S., Engler A.J., et al. // *Nat. Cell. Biol.* 2015. V. 17. № 5. P. 678–688.
100. Jung H.Y., Fattet L., Yang J. // *Clin. Cancer Res.* 2015. V. 21. № 5. P. 962–968.
101. Petrini I., Barachini S., Carnicelli V., Galimberti S., Modeo L., Boni R., Sollini M., Erba P.A. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 3. P. 4914–4921.
102. Bieri B., Pierce S.E., Kroeger C., Stover D.G., Pattabiraman D.R., Thiru P., Liu Donaher J., Reinhardt F., Chaffer C.L., Keckesova Z., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 12. P. E2337–E2346.
103. Xu Y., Lee D.K., Feng Z., Xu Y., Bu W., Li Y., Liao L., Xu J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 43. P. 11494–11499.
104. Tan T.Z., Miow Q.H., Miki Y., Noda T., Mori S., Huang R.Y., Thiery J.P. // *EMBO Mol. Med.* 2014. V. 6. № 10. P. 1279–1293.
105. Puram S.V., Tirosh I., Parikh A.S., Patel A.P., Yizhak K., Gillespie S., Rodman C., Luo C.L., Mroz E.A., Emerick K.S., et al. // *Cell.* 2017. V. 171. № 7. P. 1611–1624 e24.
106. Tsai J.H., Donaher J.L., Murphy D.A., Chau S., Yang J. // *Cancer Cell.* 2012. V. 22. № 6. P. 725–736.
107. Aiello N.M., Maddipati R., Norgard R.J., Balli D., Li J., Yuan S., Yamazoe T., Black T., Sahmoud A., Furth E.E., et al. // *Dev. Cell.* 2018. V. 45. № 6. P. 681–695 e4.
108. Shamir E.R., Pappalardo E., Jorgens D.M., Coutinho K., Tsai W.T., Aziz K., Auer M., Tran P.T., Bader J.S., Ewald A.J. // *J. Cell. Biol.* 2014. V. 204. № 5. P. 839–856.
109. Cheung K.J., Gabrielson E., Werb Z., Ewald A.J. // *Cell.* 2013. V. 155. № 7. P. 1639–1651.
110. Cheung K.J., Padmanaban V., Silvestri V., Schipper K., Cohen J.D., Fairchild A.N., Gorin M.A., Verdone J.E., Pienta K.J., Bader J.S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 7. P. E854–863.
111. Gloushankova N.A., Rubtsova S.N., Zhitnyak I.Y. // *Tissue Barriers.* 2017. V. 5. № 3. P. e1356900.
112. Reichert M., Bakir B., Moreira L., Pitarresi J.R., Feldmann K., Simon L., Suzuki K., Maddipati R., Rhim A.D., Schlitter A.M., et al. // *Dev. Cell.* 2018. V. 45. № 6. P. 696–711 e8.
113. Fischer K.R., Durrans A., Lee S., Sheng J., Li F., Wong S.T., Choi H., El Rayes T., Ryu S., Troeger J., et al. // *Nature.* 2015. V. 527. № 7579. P. 472–476.
114. Zheng X., Carstens J.L., Kim J., Scheible M., Kaye J., Sugimoto H., Wu C.C., LeBleu V.S., Kalluri R. // *Nature.* 2015. V. 527. № 7579. P. 525–530.
115. Ye X., Brabletz T., Kang Y., Longmore G.D., Nieto M.A., Stanger B.Z., Yang J., Weinberg R.A. // *Nature.* 2017. V. 547. № 7661. P. E1–E3.
116. Tran H.D., Luitel K., Kim M., Zhang K., Longmore G.D., Tran D.D. // *Cancer Res.* 2014. V. 74. № 21. P. 6330–6340.
117. Ni T., Li X.Y., Lu N., An T., Liu Z.P., Fu R., Lv W.C., Zhang Y.W., Xu X.J., Grant Rowe R., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2016. V. 18. № 11. P. 1221–1232.
118. Aiello N.M., Brabletz T., Kang Y., Nieto M.A., Weinberg R.A., Stanger B.Z. // *Nature.* 2017. V. 547. № 7661. P. E7–E8.
119. Yamashita N., Tokunaga E., Iimori M., Inoue Y., Tanaka K., Kitao H., Saeki H., Oki E., Maehara Y. // *Clin. Breast Cancer.* 2018. V. 18. № 5. P. e1003–e1009.
120. Savagner P. // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2015. V. 112. P. 273–300.
121. Petrova Y.I., Schecterson L., Gumbiner B.M. // *Mol. Biol. Cell.* 2016. V. 27. № 21. P. 3233–3244.
122. Labernadie A., Kato T., Brugues A., Serra-Picamal X., Derzsi S., Arwert E., Weston A., Gonzalez-Tarrago V., Elosegui-Artola A., Albertazzi L., et al. // *Nat. Cell. Biol.* 2017. V. 19. № 3. P. 224–237.
123. Cheung K.J., Ewald A.J. // *Science.* 2016. V. 352. № 6282. P. 167–169.
124. Yu M., Bardia A., Wittner B.S., Stott S.L., Smas M.E., Ting D.T., Isakoff S.J., Ciciliano J.C., Wells M.N., Shah A.M., et al. // *Science.* 2013. V. 339. № 6119. P. 580–584.
125. Ye X., Tam W.L., Shibue T., Kaygusuz Y., Reinhardt F., Ng Eaton E., Weinberg R.A. // *Nature.* 2015. V. 525. № 7568. P. 256–260.
126. Talmadge J.E., Fidler I.J. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 14. P. 5649–5669.
127. Jolly M.K., Boareto M., Huang B., Jia D., Lu M., Ben-Jacob E., Onuchic J.N., Levine H. // *Front. Oncol.* 2015. V. 5. № 1. P. 155.
128. Au S.H., Storey B.D., Moore J.C., Tang Q., Chen Y.L., Javaid S., Sarioglu A.F., Sullivan R., Madden M.W., O’Keefe R., et al.

- // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 18. P. 4947–4952.
129. Kusters B., Kats G., Roodink I., Verrijp K., Wesseling P., Ruiters D.J., de Waal R.M., Leenders W.P. // *Oncogene*. 2007. V. 26. № 39. P. 5808–5815.
130. Aceto N., Bardia A., Miyamoto D.T., Donaldson M.C., Wittner B.S., Spencer J.A., Yu M., Pely A., Engstrom A., Zhu H., et al. // *Cell*. 2014. V. 158. № 5. P. 1110–1122.
131. McFadden D.G., Papagiannakopoulos T., Taylor-Weiner A., Stewart C., Carter S.L., Cibulskis K., Bhutkar A., McKenna A., Dooley A., Vernon A., et al. // *Cell*. 2014. V. 156. № 6. P. 1298–1311.
132. Gundem G., Van Loo P., Kremeyer B., Alexandrov L.B., Tubio J.M.C., Papaemmanuil E., Brewer D.S., Kallio H.M.L., Hognas G., Annala M., et al. // *Nature*. 2015. V. 520. № 7547. P. 353–357.
133. Lecharpentier A., Vielh P., Perez-Moreno P., Planchard D., Soria J.C., Farace F. // *Br. J. Cancer*. 2011. V. 105. № 9. P. 1338–1341.
134. Armstrong A.J., Marengo M.S., Oltean S., Kemeny G., Bitting R.L., Turnbull J.D., Herold C.I., Marcom P.K., George D.J., Garcia-Blanco M.A. // *Mol. Cancer Res.* 2011. V. 9. № 8. P. 997–1007.
135. Burz C., Pop V.V., Buiga R., Daniel S., Samasca G., Aldea C., Lupan I. // *Oncotarget*. 2018. V. 9. № 36. P. 24561–24571.
136. Hou J.M., Krebs M.G., Lancashire L., Sloane R., Backen A., Swain R.K., Priest L.J., Greystoke A., Zhou C., Morris K., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2012. V. 30. № 5. P. 525–532.
137. Zhang D., Zhao L., Zhou P., Ma H., Huang F., Jin M., Dai X., Zheng X., Huang S., Zhang T. // *Cancer Cell Int.* 2017. V. 17. № 1. P. 6.
138. George J.T., Jolly M.K., Xu S., Somarelli J.A., Levine H. // *Cancer Res.* 2017. V. 77. № 22. P. 6415–6428.
139. Papadaki M.A., Stoupis G., Theodoropoulos P.A., Mavroudis D., Georgoulas V., Agelaki S. // *Mol. Cancer Ther.* 2019. V. 18. № 2. P. 437–447.
140. Hong K.O., Kim J.H., Hong J.S., Yoon H.J., Lee J.J., Hong S.P., Hong S.D. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2009. V. 28. № 1. P. 28.
141. Stankic M., Pavlovic S., Chin Y., Brogi E., Padua D., Norton L., Massague J., Benezra R. // *Cell. Rep.* 2013. V. 5. № 5. P. 1228–1242.
142. Chaffer C.L., Brennan J.P., Slavin J.L., Blick T., Thompson E.W., Williams E.D. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 23. P. 11271–11278.
143. Patil S., Rao R.S., Ganavi B.S. // *J. Int. Oral Hlth.* 2015. V. 7. № 9. P. i-ii.
144. Hiramoto H., Muramatsu T., Ichikawa D., Tanimoto K., Yasukawa S., Otsuji E., Inazawa J. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 4002.
145. Lv M., Zhong Z., Huang M., Tian Q., Jiang R., Chen J. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* 2017. V. 1864. № 10. P. 1887–1899.
146. Shi Z.M., Wang L., Shen H., Jiang C.F., Ge X., Li D.M., Wen Y.Y., Sun H.R., Pan M.H., Li W., et al. // *Oncogene*. 2017. V. 36. № 18. P. 2577–2588.
147. Li Y., Zhang H., Li Y., Zhao C., Fan Y., Liu J., Li X., Liu H., Chen J. // *Mol. Carcinog.* 2018. V. 57. № 1. P. 125–136.
148. He Z., Yu L., Luo S., Li M., Li J., Li Q., Sun Y., Wang C. // *BMC Cancer*. 2017. V. 17. № 1. P. 140.
149. Hu H., Xu Z., Li C., Xu C., Lei Z., Zhang H.T., Zhao J. // *Lung Cancer*. 2016. V. 97. P. 87–94.
150. Xu D., Liu S., Zhang L., Song L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 485. № 2. P. 556–562.
151. Yu W.W., Jiang H., Zhang C.T., Peng Y. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 24. P. 39280–39295.
152. Cheng C.W., Hsiao J.R., Fan C.C., Lo Y.K., Tzen C.Y., Wu L.W., Fang W.Y., Cheng A.J., Chen C.H., Chang I.S., et al. // *Mol. Carcinog.* 2016. V. 55. № 5. P. 499–513.
153. Yu M., Han G., Qi B., Wu X. // *Oncol. Rep.* 2017. V. 37. № 4. P. 2121–2128.
154. Yano T., Fujimoto E., Hagiwara H., Sato H., Yamasaki H., Negishi E., Ueno K. // *Biol. Pharm. Bull.* 2006. V. 29. № 10. P. 1991–1994.
155. Alaga K.C., Crawford M., Dagnino L., Laird D.W. // *J. Cancer*. 2017. V. 8. № 7. P. 1123–1128.
156. Frisch S.M., Farris J.C., Pifer P.M. // *Oncogene*. 2017. V. 36. № 44. P. 6067–6073.
157. Nishino H., Takano S., Yoshitomi H., Suzuki K., Kagawa S., Shimazaki R., Shimizu H., Furukawa K., Miyazaki M., Ohtsuka M. // *Cancer Med.* 2017. V. 6. № 11. P. 2686–2696.
158. Chen W., Kang K.L., Alshaiikh A., Varma S., Lin Y.L., Shin K.H., Kim R., Wang C.Y., Park N.H., Walentin K., et al. // *Oncogenesis*. 2018. V. 7. № 5. P. 38.
159. Riethdorf S., Frey S., Santjer S., Stoupiec M., Otto B., Riethdorf L., Koop C., Wilczak W., Simon R., Sauter G., et al. // *Int. J. Cancer*. 2016. V. 138. № 4. P. 949–963.
160. Pan X., Zhang R., Xie C., Gan M., Yao S., Yao Y., Jin J., Han T., Huang Y., Gong Y., et al. // *Am. J. Transl. Res.* 2017. V. 9. № 9. P. 4217–4226.
161. Chen W., Yi J.K., Shimane T., Mehrazarin S., Lin Y.L., Shin K.H., Kim R.H., Park N.H., Kang M.K. // *Carcinogenesis*. 2016. V. 37. № 5. P. 500–510.
162. Werner S., Frey S., Riethdorf S., Schulze C., Alawi M., Kling L., Vafaizadeh V., Sauter G., Terracciano L., Schumacher U., et al. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 32. P. 2993–3008.
163. Mooney S.M., Talebian V., Jolly M.K., Jia D., Gromala M., Levine H., McConkey B.J. // *J. Cell. Biochem.* 2017. V. 118. № 9. P. 2559–2570.
164. Paltoglou S., Das R., Townley S.L., Hickey T.E., Tarulli G.A., Coutinho I., Fernandes R., Hanson A.R., Denis I., Carroll J.S., et al. // *Cancer Res.* 2017. V. 77. № 13. P. 3417–3430.
165. Xiang J., Fu X., Ran W., Wang Z. // *Oncogenesis*. 2017. V. 6. № 1. P. e284.
166. Pawlak M., Kikulska A., Wrzesinski T., Rausch T., Kwias Z., Wilczynski B., Benes V., Wesoly J., Wilanowski T. // *Mol. Carcinog.* 2017. V. 56. № 11. P. 2414–2423.
167. Li R., Liang J., Ni S., Zhou T., Qing X., Li H., He W., Chen J., Li F., Zhuang Q., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 7. № 1. P. 51–63.
168. Samavarchi-Tehrani P., Golipour A., David L., Sung H.K., Beyer T.A., Datti A., Woltjen K., Nagy A., Wrana J.L. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 7. № 1. P. 64–77.
169. Zhang X., Cruz F.D., Terry M., Remotti F., Matushansky I. // *Oncogene*. 2013. V. 32. № 18. P. 2249–60, 2260 e1–2221.
170. Miyoshi N., Ishii H., Nagai K., Hoshino H., Mimori K., Tanaka F., Nagano H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 1. P. 40–45.
171. Takaishi M., Tarutani M., Takeda J., Sano S. // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 6. P. e0156904.
172. Chang C.C., Hsu W.H., Wang C.C., Chou C.H., Kuo M.Y., Lin B.R., Chen S.T., Tai S.K., Kuo M.L., Yang M.H. // *Cancer Res.* 2013. V. 73. № 13. P. 4147–4157.
173. Zhang C., Zhi W.I., Lu H., Samanta D., Chen I., Gabrielson E., Semenza G.L. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 40. P. 64527–64542.
174. Zhang J.M., Wei K., Jiang M. // *Breast Cancer*. 2018. V. 25. № 4. P. 447–455.
175. Rasti A., Mehrzama M., Madjd Z., Abolhasani M., Saeednejad Zanjani L., Asgari M. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 11739.
176. You L., Guo X., Huang Y. // *Yonsei Med. J.* 2018. V. 59. № 1.

- P. 35–42.
177. Chen S., Chen X., Li W., Shan T., Lin W.R., Ma J., Cui X., Yang W., Cao G., Li Y., et al. // *Oncol. Lett.* 2018. V. 15. № 5. P. 7144–7152.
178. Del Pozo Martin Y., Park D., Ramachandran A., Ombrato L., Calvo F., Chakravarty P., Spencer-Dene B., Derzsi S., Hill C.S., Sahai E., et al. // *Cell Rep.* 2015. V. 13. № 11. P. 2456–2469.
179. Yates C.C., Shepard C.R., Stolz D.B., Wells A. // *Br. J. Cancer.* 2007. V. 96. № 8. P. 1246–1252.
180. Ju J.A., Godet I., Ye I.C., Byun J., Jayatilaka H., Lee S.J., Xiang L., Samanta D., Lee M.H., Wu P.H., et al. // *Mol. Cancer Res.* 2017. V. 15. № 6. P. 723–734.
181. Wu Z.H., Tao Z.H., Zhang J., Li T., Ni C., Xie J., Zhang J.F., Hu X.C. // *Tumour Biol.* 2016. V. 37. № 6. P. 7245–7254.
182. Yao Y., Pang T., Cheng Y., Yong W., Kang H., Zhao Y., Wang S., Hu X. // *Pathol. Oncol. Res.* 2019. V. 26. № 3. P. 1639–1649.
183. Liang H., Chen G., Li J., Yang F. // *Am. J. Transl. Res.* 2019. V. 11. № 7. P. 4277–4289.
184. Liang F., Ren C., Wang J., Wang S., Yang L., Han X., Chen Y., Tong G., Yang G. // *Oncogenesis.* 2019. V. 8. № 10. P. 59.
185. Chang L., Hu Y., Fu Y., Zhou T., You J., Du J., Zheng L., Cao J., Ying M., Dai X., et al. // *Acta Pharm. Sin. B.* 2019. V. 9. № 3. P. 484–495.
186. Wang P., Chen J., Mu L.H., Du Q.H., Niu X.H., Zhang M.Y. // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2013. V. 17. № 13. P. 1722–1729.
187. Haslehurst A.M., Koti M., Dharsee M., Nuin P., Evans K., Geraci J., Childs T., Chen J., Li J., Weberpals J., et al. // *BMC Cancer.* 2012. V. 12. P. 91.
188. Gupta N., Xu Z., El-Sehemy A., Steed H., Fu Y. // *Gynecol. Oncol.* 2013. V. 130. № 1. P. 200–206.
189. Oh S.J., Ahn E.J., Kim O., Kim D., Jung T.Y., Jung S., Lee J.H., Kim K.K., Kim H., Kim E.H., et al. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2019. V. 39. № 6. P. 769–782.
190. Shen C.J., Kuo Y.L., Chen C.C., Chen M.J., Cheng Y.M. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 3. P. e0174487.
191. Xiao G., Li Y., Wang M., Li X., Qin S., Sun X., Liang R., Zhang B., Du N., Xu C., et al. // *Cell Prolif.* 2018. V. 51. № 5. P. e12473.
192. Kast R.E., Skuli N., Karpel-Massler G., Frosina G., Ryken T., Halatsch M.E. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 37. P. 60727–60749.
193. Evdokimova V., Tognon C., Ng T., Sorensen P.H. // *Cell Cycle.* 2009. V. 8. № 18. P. 2901–2906.
194. Chen K.Y., Chen C.C., Chang Y.C., Chang M.C. // *PLoS One.* 2019. V. 14. № 7. P. e0219317.
195. Weyemi U., Redon C.E., Choudhuri R., Aziz T., Maeda D., Boufraquech M., Parekh P.R., Sethi T.K., Kasoji M., Abrams N., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. № 1. P. 10711.
196. Hsu D.S., Lan H.Y., Huang C.H., Tai S.K., Chang S.Y., Tsai T.L., Chang C.C., Tzeng C.H., Wu K.J., Kao J.Y., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2010. V. 16. № 18. P. 4561–4571.
197. Chakraborty S., Kumar A., Faheem M.M., Katoch A., Kumar A., Jamwal V.L., Nayak D., Golani A., Rasool R.U., Ahmad S.M., et al. // *Cell Death Dis.* 2019. V. 10. № 6. P. 467.
198. Zhang P., Wei Y., Wang L., Debeb B.G., Yuan Y., Zhang J., Yuan J., Wang M., Chen D., Sun Y., et al. // *Nat. Cell. Biol.* 2014. V. 16. № 9. P. 864–875.
199. Song N., Jing W., Li C., Bai M., Cheng Y., Li H., Hou K., Li Y., Wang K., Li Z., et al. // *Cell Cycle.* 2018. V. 17. № 5. P. 595–604.
200. Qian J., Shen S., Chen W., Chen N. // *Biomed. Res. Int.* 2018. V. 2018. № 1. P. 4174232.
201. Meng Q., Shi S., Liang C., Liang D., Hua J., Zhang B., Xu J., Yu X. // *Oncogene.* 2018. V. 37. № 44. P. 5843–5857.
202. Kim T.W., Lee S.Y., Kim M., Cheon C., Jang B.H., Shin Y.C., Ko S.G. // *Cell Death Dis.* 2018. V. 9. № 6. P. 649.
203. Prabhakar C.N. // *Transl. Lung Cancer Res.* 2015. V. 4. № 2. P. 110–118.
204. Yochum Z.A., Cades J., Wang H., Chatterjee S., Simons B.W., O'Brien J.P., Khetarpal S.K., Lemtiri-Chlieh G., Myers K.V., Huang E.H., et al. // *Oncogene.* 2019. V. 38. № 5. P. 656–670.
205. Iderzorig T., Kellen J., Osude C., Singh S., Woodman J.A., Garcia C., Puri N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 496. № 2. P. 770–777.
206. Hu F.Y., Cao X.N., Xu Q.Z., Deng Y., Lai S.Y., Ma J., Hu J.B. // *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 2016. V. 36. № 6. P. 839–845.
207. Lee A.F., Chen M.C., Chen C.J., Yang C.J., Huang M.S., Liu Y.P. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 7. P. e0180383.
208. Du X., Shao Y., Qin H.F., Tai Y.H., Gao H.J. // *Thorac. Cancer.* 2018. V. 9. № 4. P. 423–430.
209. Voena C., Varesio L.M., Zhang L., Menotti M., Poggio T., Panizza E., Wang Q., Minero V.G., Fagoonee S., Compagno M., et al. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 22. P. 33316–33330.
210. Nakamichi S., Seike M., Miyanaga A., Chiba M., Zou F., Takahashi A., Ishikawa A., Kunugi S., Noro R., Kubota K., et al. // *Oncotarget.* 2018. V. 9. № 43. P. 27242–27255.
211. Fukuda K., Takeuchi S., Arai S., Katayama R., Nanjo S., Tanimoto A., Nishiyama A., Nakagawa T., Taniguchi H., Suzuki T., et al. // *Cancer Res.* 2019. V. 79. № 7. P. 1658–1670.
212. Zhou L., Liu X.D., Sun M., Zhang X., German P., Bai S., Ding Z., Tannir N., Wood C.G., Matin S.F., et al. // *Oncogene.* 2016. V. 35. № 21. P. 2687–2697.
213. Wang Q., Gun M., Hong X.Y. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 14140.
214. Dong H., Hu J., Zou K., Ye M., Chen Y., Wu C., Chen X., Han M. // *Mol. Cancer.* 2019. V. 18. № 1. P. 3.
215. Wu Y., Ginther C., Kim J., Mosher N., Chung S., Slamon D., Vadgama J.V. // *Mol. Cancer Res.* 2012. V. 10. № 12. P. 1597–1606.
216. Krummel M.F., Allison J.P. // *J. Exp. Med.* 1995. V. 182. № 2. P. 459–465.
217. Leach D.R., Krummel M.F., Allison J.P. // *Science.* 1996. V. 271. № 5256. P. 1734–1736.
218. Dong H., Strome S.E., Salomao D.R., Tamura H., Hirano F., Flies D.B., Roche P.C., Lu J., Zhu G., Tamada K., et al. // *Nat. Med.* 2002. V. 8. № 8. P. 793–800.
219. Iwai Y., Ishida M., Tanaka Y., Okazaki T., Honjo T., Minato N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 19. P. 12293–12297.
220. Iwai Y., Terawaki S., Honjo T. // *Int. Immunol.* 2005. V. 17. № 2. P. 133–144.
221. Hargadon K.M., Johnson C.E., Williams C.J. // *Int. Immunopharmacol.* 2018. V. 62. № 1. P. 29–39.
222. Raimondi C., Carpino G., Nicolazzo C., Gradilone A., Gianni W., Gelibter A., Gaudio E., Cortesi E., Gazzaniga P. // *Oncoimmunology.* 2017. V. 6. № 12. P. e1315488.
223. Thar Min A.K., Okayama H., Saito M., Ashizawa M., Aoto K., Nakajima T., Saito K., Hayase S., Sakamoto W., Tada T., et al. // *Cancer Med.* 2018. V. 7. № 7. P. 3321–3330.
224. Noman M.Z., Janji B., Abdou A., Hasmim M., Terry S., Tan T.Z., Mami-Chouaib F., Thierry J.P., Chouaib S. // *Oncoimmunology.* 2017. V. 6. № 1. P. e1263412.
225. Asgarova A., Asgarov K., Godet Y., Peixoto P., Nadaradjane A., Boyer-Guittaut M., Galaine J., Guenat D., Mougey V., Perrard J., et al. // *Oncoimmunology.* 2018. V. 7. № 5. P. e1423170.
226. Ock C.Y., Kim S., Keam B., Kim M., Kim T.M., Kim J.H., Jeon Y.K., Lee J.S., Kwon S.K., Hah J.H., et al. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 13. P. 15901–15914.
227. Funaki S., Shintani Y., Kawamura T., Kanzaki R., Minami

- M., Okumura M. // *Oncol. Rep.* 2017. V. 38. № 4. P. 2277–2284.
228. Noman M.Z., van Moer K., Marani V., Gemmill R.M., Tranchevent L.C., Azuaje F., Muller A., Chouaib S., Thiery J.P., Berchem G., et al. // *Oncoimmunology.* 2018. V. 7. № 4. P. e1345415.
229. Chae Y.K., Chang S., Ko T., Anker J., Agte S., Iams W., Choi W.M., Lee K., Cruz M. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 2918.
230. Lou Y., Diao L., Cuentas E.R., Denning W.L., Chen L., Fan Y.H., Byers L.A., Wang J., Papadimitrakopoulou V.A., Behrens C., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2016. V. 22. № 14. P. 3630–3642.
231. Wang L., Saci A., Szabo P.M., Chasalow S.D., Castillo-Martin M., Domingo-Domenech J., Siefker-Radtke A., Sharma P., Sfakianos J.P., Gong Y., et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 3503.
232. Makena M.R., Ranjan A., Thirumala V., Reddy A.P. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2018. V. 1866. № 4. P. 165339.
233. Cojoc M., Mabert K., Muders M.H., Dubrovskaya A. // *Semin. Cancer Biol.* 2015. V. 31. № 1. P. 16–27.
234. Phi L.T.H., Sari I.N., Yang Y.G., Lee S.H., Jun N., Kim K.S., Lee Y.K., Kwon H.Y. // *Stem Cells Int.* 2018. V. 2018. № 1. P. 5416923.
235. Li S., Li Q. // *Int. J. Oncol.* 2014. V. 44. № 6. P. 1806–1812.
236. Prasetyanti P.R., Medema J.P. // *Mol. Cancer.* 2017. V. 16. № 1. P. 41.
237. Zhou P., Li B., Liu F., Zhang M., Wang Q., Liu Y., Yao Y., Li D. // *Mol. Cancer.* 2017. V. 16. № 1. P. 52.
238. Hope K.J., Jin L., Dick J.E. // *Nat. Immunol.* 2004. V. 5. № 7. P. 738–743.
239. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // *Cell.* 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
240. Nouri M., Caradec J., Lubik A.A., Li N., Hollier B.G., Takhar M., Altimirano-Dimas M., Chen M., Roshan-Moniri M., Butler M., et al. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 12. P. 18949–18967.
241. Mani S.A., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M., et al. // *Cell.* 2008. V. 133. № 4. P. 704–715.
242. Morel A.P., Lievre M., Thomas C., Hinkal G., Ansieau S., Puisieux A. // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 8. P. e2888.
243. Junk D.J., Bryson B.L., Smigiel J.M., Parameswaran N., Bartel C.A., Jackson M.W. // *Oncogene.* 2017. V. 36. № 28. P. 4001–4013.
244. Smigiel J.M., Parameswaran N., Jackson M.W. // *Mol. Cancer Res.* 2017. V. 15. № 4. P. 478–488.
245. Ruan D., He J., Li C.F., Lee H.J., Liu J., Lin H.K., Chan C.H. // *Oncogene.* 2017. V. 36. № 30. P. 4299–4310.
246. Lee Y., Shin J.H., Longmire M., Wang H., Kohrt H.E., Chang H.Y., Sunwoo J.B. // *Clin. Cancer Res.* 2016. V. 22. № 14. P. 3571–3581.
247. Peitzsch C., Nathansen J., Schniewind S.I., Schwarz F., Dubrovskaya A. // *Cancers (Basel).* 2019. V. 11. № 5. P. 616.
248. Yoon C., Cho S.J., Chang K.K., Park D.J., Ryeom S.W., Yoon S.S. // *Mol. Cancer Res.* 2017. V. 15. № 8. P. 1106–1116.
249. Ma X., Wang B., Wang X., Luo Y., Fan W. // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 4. P. e0192436.
250. Wei C.Y., Zhu M.X., Yang Y.W., Zhang P.F., Yang X., Peng R., Gao C., Lu J.C., Wang L., Deng X.Y., et al. // *J. Hematol. Oncol.* 2019. V. 12. № 1. P. 21.
251. Lin J.C., Tsai J.T., Chao T.Y., Ma H.I., Liu W.H. // *Cancers (Basel).* 2018. V. 10. № 12. P. 512.
252. Li N., Babaei-Jadidi R., Lorenzi F., Spencer-Dene B., Clarke P., Domingo E., Tulchinsky E., Vries R.G.J., Kerr D., Pan Y., et al. // *Oncogenesis.* 2019. V. 8. № 3. P. 13.
253. Tsoumas D., Nikou S., Giannopoulou E., Champeris Tsaniras S., Sirinian C., Maroulis I., Taraviras S., Zolota V., Kalofonos H.P., Bravou V. // *Cancer Genomics Proteomics.* 2018. V. 15. № 2. P. 127–141.
254. Melisi D., Garcia-Carbonero R., Macarulla T., Pezet D., Deplanque G., Fuchs M., Trojan J., Kozloff M., Simionato F., Cleverly A., et al. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2019. V. 83. № 5. P. 975–991.
255. Santini V., Valcarcel D., Platzbecker U., Komrokji R.S., Cleverly A.L., Lahn M.M., Janssen J., Zhao Y., Chiang A., Giagounidis A., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2019. V. 25. № 23. P. 6976–6985.
256. Sato M., Kadota M., Tang B., Yang H.H., Yang Y.A., Shan M., Weng J., Welsh M.A., Flanders K.C., Nagano Y., et al. // *Breast Cancer Res.* 2014. V. 16. № 3. P. R57.
257. Formenti S.C., Hawtin R.E., Dixit N., Evensen E., Lee P., Goldberg J.D., Li X., Vanpouille-Box C., Schaud D., McBride W.H., et al. // *J. Immunother. Cancer.* 2019. V. 7. № 1. P. 177.
258. Yochum Z.A., Cades J., Mazzacurati L., Neumann N.M., Khetarpal S.K., Chatterjee S., Wang H., Attar M.A., Huang E.H., Chatley S.N., et al. // *Mol. Cancer Res.* 2017. V. 15. № 12. P. 1764–1776.

УДК 577.152.314:577.112.7:615.277.3

Надмолекулярная организация как фактор цитотоксичности рибонуклеаз

Е. В. Дудкина*, В. В. Ульянова, О. Н. Ильинская

Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань, 420008 Россия

*E-mail: lenatimonina@rambler.ru

Поступила в редакцию 11.05.2020

Принята к печати 29.06.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11000

РЕФЕРАТ Одним из подходов к элиминации опухолевых клеток является направленная деструкция/модификация молекул их РНК, поэтому считается, что рибонуклеазы (РНказы) обладают терапевтическим потенциалом, во многом еще не изученным. Предполагается, что биологические эффекты секретируемых РНказ, а именно их противоопухолевые и противовирусные свойства, обусловлены каталитической активностью. Однако ряд современных данных опровергает исключительную роль ферментативной активности РНказ в проявлении их селективной цитотоксичности по отношению к раковым клеткам. В настоящем обзоре мы анализируем современные данные о цитотоксических эффектах секретируемых РНказ, проявляющихся без участия каталитической активности, и приводим доказательства того, что важнейшим фактором селективного апоптозиндуцирующего действия РНказ является структурная организация ферментов, обуславливающая их взаимодействие с компонентами клетки. Приведенные доказательства в пользу приоритетной роли некаталитических взаимодействий РНказ с раковыми клетками в проявлении избирательной цитотоксичности вносят вклад в разработку противоопухолевых препаратов на базе РНказ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рибонуклеаза, димер, олигомеризация, каталитическая активность, цитотоксичность, противоопухолевая активность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ дцРНК – двухцепочечная РНК; ИР – ингибитор рибонуклеаз млекопитающих; BS-РНказа – рибонуклеаза семенников быка.

ВВЕДЕНИЕ

Рибонуклеазы (РНказы) катализируют расщепление фосфодиэфирных связей в различных РНК-субстратах, играя ключевую роль в деградации и процессинге клеточной РНК [1]. Большинство известных РНказ являются белками, однако обнаружены и нетипичные формы РНказ, каталитическая часть которых представлена молекулой РНК. Таким образом, РНказы – одни из немногих ферментов, которые, по-видимому, до сих пор сохраняют связь с первичным миром РНК, древней системой репликаторов и катализаторов РНК [1].

РНказы классифицируют на экзо- и эндорибонуклеазы. Экзорибонуклеазы осуществляют гидролиз фосфодиэфирной связи между нуклеотидами, находящимися на концах полинуклеотидной цепи, в направлении $3' \rightarrow 5'$. Эндонуклеазы расщепляют фосфодиэфирные связи внутри одноцепочечных или двухцепочечных молекул РНК.

Клетки живых организмов содержат различные виды экзо- и эндорибонуклеаз, основная функция которых заключается в контроле экспрессии генов путем изменения стабильности различных видов РНК и элиминации ненужных внутриклеточных РНК [2]. Кроме того, расщепляя проникшие в клетки чужеродные РНК [3] и участвуя в клеточном суициде, РНказы играют защитную роль [4].

Секретируемые РНказы микроорганизмов выполняют пищеварительную, защитную и регуляторную функции. Они необходимы для гидролиза РНК во внеклеточном пространстве. Считается, что у микроорганизмов расщепление внеклеточной РНК происходит в основном с целью извлечения питательных веществ. Лишь отдельные сообщения указывают на вовлечение секретируемых РНказ микроорганизмов в конкурентную борьбу за экологическую нишу [5], в реализацию патогенного потенциала [6–8], в защиту своей популяции, а также

ассоциированных организмов от вирусной инфекции [9, 10].

У высших организмов секретлируемые РНКазы, наоборот, в меньшей степени участвуют в переваривании пищи и представляют собой компоненты врожденной системы защиты и поддержания физиологического гомеостаза. У растений они обуславливают самонесовместимость [11]. У позвоночных животных секретлируемые РНКазы гидролизуют внеклеточную РНК, которая высвобождается из поврежденных, стресс-индуцированных или малигнизированных клеток, оказывая противовоспалительное и антикоагулянтное действие; обладают противомикробной и противовирусной активностями, а также иммуномодулирующими и регенеративными свойствами [12].

Отдельные виды секретлируемых РНКаз животных вовлечены в туморогенез [13], в то время как другие подавляют пролиферацию раковых клеток и индуцируют в них апоптоз [14–19], что позволяет рассматривать РНКазы в качестве потенциальных противоопухолевых агентов в щадящей терапии злокачественных новообразований. Селективной цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам обладают и микробные РНКазы [18–22], нечувствительные к ингибитору РНКаз млекопитающих (ИР), что открывает широкие возможности для биоинженерии [23]. РНКазы могут быть интернализированы клетками путем рецептор-зависимого эндоцитоза для регуляции сигнальных путей и внутриклеточных РНК [13]. При этом рибонуклеолитическая активность как таковая не всегда имеет первостепенное значение, вероятно, ключевая роль принадлежит физико-химическим и структурным свойствам белков.

СЕКРЕТИРУЕМЫЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ БАЦИЛЛ

Среди внеклеточных РНКаз бактерий, проявляющих противоопухолевую активность, подробно охарактеризованы секретлируемые РНКазы бацилл [19, 20, 22, 24, 25]. Бациллярные РНКазы представлены двумя типами эндонуклеолитических ферментов: низкомолекулярными гуанилпредпочитающими РНКазами [24] и высокомолекулярными неспецифичными РНКазами [26, 27]. Высокомолекулярные РНКазы бацилл (биназа II, РНКазы Bsn), представляющие семейство HNH эндонуклеаз (IPR003615), состоят примерно из 240 аминокислотных остатков (30 кДа). Эти белки, стабильные в диапазоне pH 6.5–9.5, имеют изоэлектрическую точку, равную примерно 5, и расщепляют РНК без видимой специфичности с образованием 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов. Для проявления каталитической активности необходимы ионы Mg^{2+} . Оптимум pH для гидролиза РНК составляет 8.5, оптимум температуры – 37°C.

Низкомолекулярные гуанилпредпочитающие РНКазы бацилл (биназа, барназа), относящиеся к семейству N1/T1/U2 (IPR000026), представляют собой малые внеклеточные белки, состоящие примерно из 110 аминокислотных остатков (12 кДа). Ферменты стабильны в широком диапазоне pH (3–10). Гуанилспецифичные РНКазы относятся к катионным белкам с изоэлектрической точкой около 9. Они катализируют расщепление РНК предпочтительно у остатков гуанозина в две последовательные реакции, в ходе которых трансэтерификация 5'-фосфоэфирной связи приводит к образованию циклических 2',3'-фосфодиэфиров как промежуточных продуктов гидролиза с их последующим расщеплением до нуклеозид-3'-фосфатов [28]. Для проявления каталитической активности ферменты не нуждаются в ионах металлов и кофакторах [29]. Оптимальные условия для гидролиза РНК – pH 8.5 и 37°C.

Синтез внеклеточных РНКаз у бацилл индуцируется, за редким исключением, в условиях фосфатного голодания [30, 31], а низкомолекулярных РНКаз – еще и в условиях азотного голодания [32], что указывает на значимость этих ферментов для обеспечения клеток питательными веществами. Стоит отметить, что уровень РНКазной активности низкомолекулярных РНКаз на 1–2 порядка выше, чем у высокомолекулярных. Низкомолекулярные РНКазы также отличают особенности механизма рибонуклеолитической реакции – предпочтительность к гуаниловым остаткам, образование циклических 2',3'-рибонуклеотидов, которые сохраняются в реакционной среде не менее 1 ч [33], и фосфатная группа на 3'-конце образуемых нуклеотидов. В настоящее время 2',3'-циклопроизводные нуклеотидов, обнаруживаемые как у про-, так и у эукариот, рассматриваются у эукариот в качестве компонентов пути, защищающего ткани от инфекций и повреждений [34]. Нуклеотиды с 5'-концевым фосфатом могут быть лигированы с подобными нуклеотидами с образованием полимерных структур, в то время как встраивание нуклеотида с 3'-концевым фосфатом требует дополнительных реакций по переносу фосфатной группы на 5'-конец. Эти особенности, наряду с тем, что высокомолекулярные РНКазы широко представлены в мире бактерий, а низкомолекулярные имеются лишь у ограниченного числа видов бактерий [35], позволяют считать низкомолекулярные РНКазы бацилл уникальными белками и предполагают наличие у них особых функций и биологических свойств.

Так, имеются данные, косвенно указывающие на антагонистические свойства низкомолекулярных РНКаз [5, 24] и их участие в защите бактериальных клеток от фаговой инфекции [9]. У патогенных

бацилл группы *Bacillus cereus* низкомолекулярные РНКазы входят в состав поверхностных токсинов [35]. На сегодняшний день показаны разнообразные биологические эффекты низкомолекулярных РНКаз бацилл – от ростостимулирующих до антипролиферативных [19, 20, 22, 36, 37], что делает их перспективными для практического применения. Потенциал же высокомолекулярных РНКаз бацилл еще не изучен.

Низкомолекулярные РНКазы бацилл обладают высокой степенью сходства по первичной структуре (более 73%), основные различия сосредоточены в регуляторных областях генов, что опосредует разный уровень продукции этих белков, а также в сигнальных пептидах, влияющих на их секрецию [35]. Ферменты имеют практически идентичную третичную структуру, обладают общими физико-химическими и каталитическими свойствами. Аминокислотные остатки His и Glu в активном центре ферментов действуют как общие кислотно-основные группы во время катализа, а Arg и Lys важны для связывания фосфата.

Первые работы по выделению и очистке низкомолекулярных РНКаз появились в 70-х годах прошлого столетия: были выделены и охарактеризованы РНКазы *B. amyloliquefaciens* (барназа) и РНКазы *B. pumilus* 7P (биназа) [38, 39]. Нами усовершенствован метод выделения бациллярных РНКаз, позволяющий в три этапа получать гомогенный препарат белка. С помощью этого метода выделены, хроматографически очищены и охарактеризованы гуанилпредпочитающие РНКазы *B. pumilus* 7P (биназа), *B. altitudinis* В-388 (бальназа) и *B. licheniformis* (балифаза) [30, 40, 41]. Среди представленных видов наиболее активным продуцентом РНКазы является вид *B. pumilus*, секретирующий биназу. Близким гомологом биназы долгое время считалась рибонуклеаза *B. amyloliquefaciens* – барназа. Сходство первичной структуры биназы и барназы составляет 85%, однако синтез барназы не подвержен фосфатной регуляции и зависит от многофункционального белка Spo0A [24].

Исследование новой РНКазы бальназы, секретируемой штаммом *B. altitudinis* В-388, показало, что именно она представляет собой наиболее близкий естественный гомолог биназы. Первичные структуры белков отличаются лишь одной аминокислотной заменой: треонин в положении 106 в молекуле биназы заменен на аланин у бальназы [29], что не сказывается на изоэлектрической точке белка, но несколько снижает термостабильность [29, 42].

РНКазы *B. licheniformis* – балифаза – сходна по первичной структуре с биназой (73%) и барназой (74%). Синтез балифазы индуцируется в условиях фосфатного голодания, что сближает фермент с би-

назой и бальназой, но по физико-химическим свойствам балифаза ближе к барназе [41].

Несмотря на то что секретируемые РНКазы бацилл близки по физико-химическим и каталитическим свойствам, они различаются по способу димеризации и стабильности димерных форм, что отражается и на цитотоксических свойствах этих РНКаз.

Олигомеризация РНКаз

Олигомеризация – один из наиболее распространенных феноменов, является ключевым фактором регуляции ферментов, ионных каналов, рецепторов и факторов транскрипции. Димеры и олигомеры обуславливают стабильность белков, активируют передачу сигналов через мембрану, увеличивают ферментативную активность, расширяют возможности для регуляции, обеспечивая комбинаторную специфичность, аллостерические свойства, активацию и ингибирование каталитической активности ферментов [43].

При изучении структурной организации выделенных нами РНКаз – биназы, бальназы и балифазы – впервые было установлено, что все они димеризуются в естественных условиях среды и представляют собой природные димеры [41, 44, 45]. Вероятно, образование димеров у РНКаз – это один из важнейших процессов, необходимых ферментам для выполнения их функций и проявления биологических свойств. Несмотря на высокую степень структурного сходства, способ димеризации и стабильность димерных структур у гомологичных РНКаз сильно различаются [22].

Мы впервые обнаружили природные димерные структуры биназы, на протяжении длительного времени известной как мономер, не способный к олигомеризации [44]. Ранее димеры биназы находили только в условиях белкового кристалла [46]. Теоретическая возможность димеризации фермента в растворе рассматривалась как артефакт, который может возникать только при высокой концентрации белка [47]. Мы показали, что биназа в естественных условиях представлена димерами двух типов, различающихся механизмом образования и стабильностью. Одни димеры биназы высокостабильны, по-видимому, за счет обмена N- или C-концевыми участками и не диссоциируют в денатурирующих условиях, другие не способны к обмену доменами между мономерами (swapping-взаимодействиям), в связи с чем димеры такого типа при электрофорезе в денатурирующих условиях распадаются на мономеры [44]. У бальназы и балифазы образуются димеры только второго типа [22, 41, 45].

Молекулярное моделирование димерных структур биназы, бальназы и балифазы выявило разно-

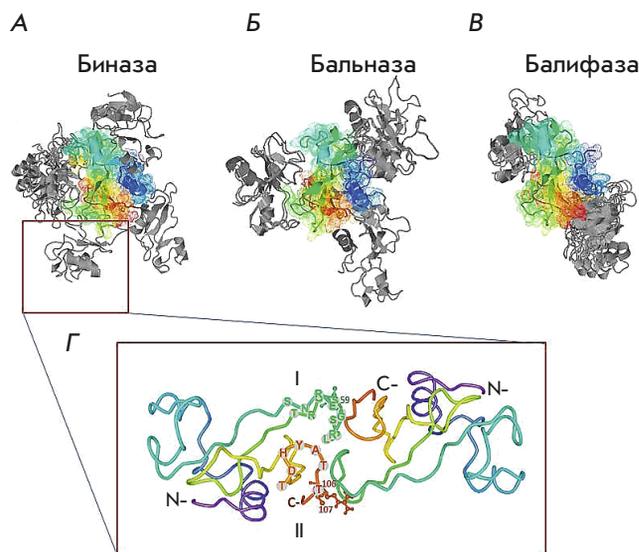


Рисунок. Модели димеров бациллярных РНКаз. Моделирование белок-белкового взаимодействия мономеров РНКаз было выполнено прямым методом путем поиска структур, обладающих минимальной свободной энергией Гиббса. Модели поделены на группы на основе сил, принимающих участие в образовании белкового комплекса (электростатических, ван-дер-ваальсовых и электростатических, гидрофобных или их баланса) и из каждой группы отобрано по две структуры с наименьшей свободной энергией. Один из мономеров биназы (А), бальназы (Б) или балифазы (В) представлен в виде молекулы с элементами вторичной структуры, окрашенной в цвета радуги от N-конца (синий) до С-конца (красный). Возможные позиции второго мономера в димерах РНКаз показаны серым цветом. (Г) Уникальный димер биназы, отсутствующий у бальназы и балифазы. Контактная поверхность в димере образована двумя гибкими петлями I (аминокислотные остатки 56–69) и II (аминокислотные остатки 99–104) [57], позволяющими мономерам обмениваться С-концевыми участками

образии их димеров (рисунок). Необходимо отметить, что димеры бациллярных РНКаз стабилизируются нековалентными связями, поскольку в первичных структурах белков отсутствуют серосодержащие аминокислоты [48]. С учетом сил, принимающих участие в образовании белкового комплекса (электростатических, гидрофобных, ван-дер-ваальсовых и электростатических или их баланса), были отобраны по две модели в каждой группе (рисунок). Обнаружено, что биназа способна к образованию димеров четырех видов (рис. А), тогда как бальназа (рис. Б) и балифаза (рис. В) – трех и двух видов соответственно, причем один из видов – это вариант с заблокированным активным центром фермента.

Анализ механизмов димеризации бациллярных РНКаз ставит вопрос о доступности активных центров для гидролиза субстрата в молекулах димеров. Изучение кристаллической формы биназы позволило сделать заключение, что связывание РНК в димере может осуществлять только одна из двух молекул мономеров, поскольку в димерной структуре блокирован каталитический центр второй субъединицы [21]. Мутантная биназа Glu43Ala/Phe81Ala обладает более высокой каталитической активностью и более выраженными цитотоксическими свойствами в отношении клеток лейкоза Касуми-1 по сравнению с ферментом дикого типа, что связывают с неспособностью мутантной формы создавать самоингибирующие димерные структуры [49].

С использованием расчетных методов броуновской динамики показано, что с учетом доступности активного центра биназа образует димеры трех типов [50]. Димерные структуры первого типа имеют два открытых каталитических центра, принимающих участие в гидролизе РНК. У димеров второго и третьего типов заблокированы один или оба активных центра. Изучение скорости ассоциации мономеров при димеризации биназы показало, что константа скорости реакции образования димеров первого типа намного выше, чем у моделей второго и третьего типов, и ее значение сопоставимо со скоростью формирования комплекса биназы и ингибитора барстара [50]. Учитывая схожий уровень каталитической активности биназы, бальназы и балифазы, а также результаты анализа интенсивности эмиссии белковых полос и площади зон гидролиза, мы можем утверждать, что в молекулах димеров исследуемых РНКаз в катализе принимают участие оба активных центра [22], а димеры с частично или полностью закрытыми активными центрами, по-видимому, являются минорными.

Стоит отметить, что большинство димеров в природе образуются именно за счет нековалентных связей между внеклеточными доменами, трансмембранными регионами и/или N,С-концами белков [51]. Последний механизм может осуществляться двумя способами. Первый – это контактная димеризация, когда петля одного из мономеров создает стабилизирующие контакты с другой молекулой, а второй способ – это обмен концевыми доменами или domain swapping [51]. Обмен доменами характерен для таких белков, как цитохром с [52] и, особенно, для некоторых амилоидогенных белков, таких, как прионный белок человека, цистатин С или β_2 -микроглобулин [53, 54].

Феномен обмена доменами частично нарушает догму Анфинсена о том, что аминокислотная последовательность определяет уникальность третичной

структуры белка [55]. На самом деле гибкие петли белка могут принимать переменные конформации, занимая более одного доступного минимума энергии [56]. Это позволяет доменам, связанным с гибкими частями белков, принимать различные ориентации и подвергаться взаимному обмену с эквивалентным доменом соседней субъединицы. Следовательно, при наличии более одной гибкой петли могут образоваться нековалентные димеры или более крупные олигомеры, что дает ферментам новые возможности для аллостерических взаимодействий и макромолекулярной передачи сигналов [57, 58]. В биназе две гибкие петли располагаются вокруг активного центра: первая петля образована аминокислотными остатками 56–69, а вторая – остатками 99–104 [59]. Обе петли находятся в непосредственной близости в разновидности димера биназы, которого нет у других РНКаз (рис. Г). В его стабилизации принимают участие Phe105, Thr106, Arg107, Glu59, Gly60. Именно Thr106 является единственным аминокислотным остатком, измененным в молекуле бальназы по сравнению с биназой. Замена полярного треонина на гидрофобный аланин отразилась на стабильности бальназы [22, 29, 42]. Предполагается возможность обмена именно С-концевыми участками при образовании стабильного димера биназы. Отсутствие такой возможности у бальназы и балифазы привело не только к существенным различиям в способах их димеризации по сравнению с биназой, но и к снижению стабильности димеров и противоопухолевого потенциала гомологичных РНКаз [22].

На сегодняшний день известно несколько представителей РНКаз, функциональность которых зависит от структурной организации их молекул. Так, например, противовирусный потенциал РНКазы L и хемоаттрактантного белка-1 моноцитов (MCP1) инициируется образованием димерных структур [60, 61]. Среди РНКаз животного происхождения наиболее полно охарактеризована РНКаз семяночника быка (BS-РНКаз), представляющая собой природный димер [62]. Обнаружена корреляция между эффективностью катализа и димеризацией микробной РНКазы T из *Escherichia coli* [63]. РНКазы *J. B. subtilis* функционирует в клетке в форме димера или олигомеров более высокого порядка [64].

Долгое время среди всего разнообразия РНКаз был известен лишь один природный димер, способный к обмену доменами – BS-РНКаз, представляющая собой смесь димеров двух типов [65]. Одни димерные структуры образуются за счет ковалентных дисульфидных мостиков между аминокислотными остатками Cys31 и Cys32, димеры второго типа дополнительно стабилизированы за счет обмена N-концами α -спиралей фермента [66]. Как оказалось, противо-

опухолевую активность проявляют только димеры второго типа. Возможность обмена доменами приводит к образованию высокостабильных димерных структур, которые не разрушаются при проникновении фермента внутрь клетки и остаются нечувствительными к действию ИР, проявляя свою цитотоксичность путем гидролиза внутриклеточной РНК [65].

Еще один представитель РНКаз, димер которого способен к обмену участками, – панкреатическая РНКазы А [67]. Фермент способен нековалентно самоассоциироваться при взаимодействии с субстратом, а также олигомеризоваться при лиофилизации в 40% уксусной кислоте [68, 69]. Образование димеров и олигомеров более высокого порядка происходит путем обмена доменами, включающим N- и/или С-концевые участки белка [70]. Swapping-олигомеры РНКазы А увеличивают свою ферментативную активность в отношении субстратов двухцепочечной РНК (дцРНК) или ДНК:РНК-гибридов по сравнению с нативным мономером [71]. Увеличение каталитической активности прямо пропорционально размеру олигомеров, более того, наибольшей ферментативной активностью обладают виды, содержащие больше С-swapping олигомерных структур, чем N-swapping, ввиду большей основности заряда С-олигомеров [72]. Противоречивые результаты получены при изучении противоопухолевого потенциала олигомеров РНКазы А, что требует проведения дальнейших исследований.

Способностью к swapping-димеризации обладает и онконаза – РНКазы леопардовой лягушки *Rana pipiens*. Фермент образует димерные структуры за счет обмена N-концевыми фрагментами при лиофилизации в 40% уксусной кислоте [73]. При этом С-конец фермента не способен принимать участие в обмене, поскольку заблокирован дисульфидной связью между Cys87 и Cys104 [58]. Димеризация онконазы усиливает ее биологическую активность, как и у других РНКаз [17, 74, 75]. Так, димер онконазы оказался более цитотоксичным для клеток рака поджелудочной железы, чем нативный мономер [73]. Усиление цитотоксичности при димеризации связывают с увеличением основности молекулы онконазы, что усиливает сродство фермента с отрицательно заряженными мембранами раковых клеток и/или их внутриклеточными мишенями [75, 76].

Олигомеризация РНКаз позволяет избежать действия ИР и усиливает заряд молекулы, улучшая интернализацию фермента в опухолевые клетки; увеличивает ферментативную активность РНКаз и их сродство к дцРНК [62, 70]; а также придает им новые биологические свойства [65, 70] или усиливает уже существующие. Таким образом, способность

к образованию олигомерных структур, причем именно за счет механизма обмена доменами, необходима РНКазам для проявления их цитотоксичности.

Противоопухолевая активность РНКаз

РНКазы обладают избирательной цитотоксичностью по отношению к определенным раковым клеткам, не оказывая при этом значимого влияния на нормальные клетки организма, что позволяет рассматривать эти ферменты в качестве потенциальной альтернативы современным противоопухолевым средствам [20, 24, 25].

Наиболее яркий представитель бактериальных РНКаз – биназа оказывает противовирусное действие в отношении вирусов гриппа типа А (H1N1), бешенства, ящура и ряда вирусов растений [77]. Биназа проявляет селективную цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам, экспрессирующим определенные онкогены: *ras*, *KIT*, *AML/ETO*, *FLT3*, *E6* и *E7* [18, 19, 21]. Несмотря на активное изучение природы селективности РНКаз, механизм их избирательного действия до сих пор остается неясным.

Биологические эффекты РНКаз определяются молекулярными детерминантами, которые вносят вклад в апоптоз-индуцирующее действие ферментов, такими, как каталитическая активность, структура и заряд молекулы, ее стабильность [25]. Однако вкладу надмолекулярной организации в цитотоксичность РНКаз до сих пор уделено мало внимания.

Долгое время считалось, что определяющую роль в проявлении цитотоксичности РНКаз играет их ферментативная активность [78]. Однако появляется все больше данных, согласно которым ферменты без каталитической активности также обладают способностью индуцировать гибель опухолевых клеток. Показано, что мутантные формы α -сарцина и катионного белка эозинофилов человека, не способные к гидролизу РНК, сохраняют свою токсичность и запускают апоптоз в раковых клетках [79, 80]. Противоопухолевая активность катионного белка эозинофилов человека обусловлена его взаимодействием с поверхностными структурами клетки, что приводит к изменению проницаемости плазматической мембраны и нарушению ионного равновесия без интернализации фермента и гидролиза внутриклеточной РНК [81]. Обнаружено, что РНКазы А и ее гомологи способны связываться с дцРНК без проявления каталитической активности, вероятно, влияя таким образом на регуляторные функции этих молекул [20]. Высокая аффинность РНКазы А к дцРНК обусловлена положительно заряженными аминокислотами, расположенными вблизи активного центра [82]. Бактериальная РНКазы III содержит два отдельных домена, один из которых предназначен для связы-

вания с дцРНК, а второй – для ее деструкции [83]. Согласно представленным данным, фермент регулирует экспрессию генов либо расщепляя дцРНК, либо связываясь с ней, что приводит к функциональным изменениям в молекуле дцРНК [83].

Хотя обработка клеток биназой приводит к снижению уровня внутриклеточной РНК, этот процесс не связан непосредственно с индукцией апоптоза [84]. На фоне снижения количества суммарной РНК увеличивается экспрессия проапоптотических генов *p53* и *hSK4* – в 1.5 и 4.3 раза соответственно, тогда как уровень мРНК антиапоптотического гена *bcl-2* снижается в 2 раза. Вероятно, гидролиз РНК-субстратов биназой приводит к запуску каскада реакций, регулирующих гены, контролирующие апоптоз [84]. Не обнаружено также прямой корреляции между снижением уровня РНК и токсическим эффектом РНКаз. Так, в клетках острого миелоидного лейкоза Касуми-1, чрезвычайно чувствительных к действию биназы, уровень суммарной РНК не изменялся даже при снижении жизнеспособности на 95% [85]. Онконаза вызывает апоптоз стимулированных митогеном лимфоцитов, не влияя на уровень внутриклеточной РНК [86].

На сегодняшний день первичное взаимодействие РНКаз с поверхностными клеточными структурами рассматривается как один из наиболее значимых процессов, играющих важную роль в запуске каскада реакций, приводящих к гибели опухолевых клеток. Интернализация РНКаз происходит либо за счет специфического взаимодействия с клеточными рецепторами [87], либо путем их прямого взаимодействия с мембраной клетки [76]. РНКазы взаимодействуют с поверхностью клетки-мишени с участием мембранных липидов, ионных каналов, рецепторов, а также посредством неспецифического электростатического связывания [88]. Показано, что нативные и мутантные димерные РНКазы сильно влияют на агрегацию, текучесть и слияние клеточных мембран [75]. Обнаружено, что РНКазы А и ее аналог – рибонуклеаза поджелудочной железы человека (РНКазы 1) – специфически взаимодействуют с нейтральным гексасахаридным гликофинголипидом Globo H [88], расположенным на внешней стороне мембраны эпителиальных клеток и в большом количестве представленным в некоторых опухолевых клетках [89]. Онконаза и BS-РНКазы взаимодействуют со специфическими небелковыми рецептороподобными молекулами на плазматической мембране, что нехарактерно для других РНКаз [90].

Одним из механизмов, обуславливающих избирательную цитотоксичность биназы и других катионных РНКаз, является способность РНКаз взаимодействовать с анионными группами на поверхности

раковых клеток [25]. Как известно, опухолевые клетки более электроотрицательны, чем нормальные, за счет большого содержания кислых фосфолипидов [91]. Димеризация ферментов приводит к увеличению катионности белка, а значит и к усилению их противоопухолевых свойств. Так, замена отрицательно заряженных аминокислотных остатков на поверхности РНКазы *Streptomyces aureofaciens* (РНКазы Sa) на положительно заряженные приводила к усилению цитотоксического потенциала фермента [92, 93]. Апоптоз индуцирующее действие РНКазы Sa по отношению к клеткам острого миелоидного лейкоза Касуми-1 достоверно коррелировало с увеличением катионности фермента [18]. Введение положительно заряженных остатков в аминокислотную последовательность белка усиливало цитотоксичность онконазы [94].

Однако оказалось, что одного повышения заряда недостаточно для успешной интернализации РНКаз в клетку. Показана исключительно важная роль специфической ориентации молекулы РНКазы (онконазы, BS-РНКазы, РНКазы 1 и РНКазы А) относительно клеточной мембраны [76]. Так, нативная димерная BS-РНКазы принимает наиболее выгодную для своей интернализации ориентацию, когда она обращена обоими N-концами к клеточной мембране [75]. Мутант Gly38Lys BS-РНКазы, наделенный дополнительным катионным остатком, ориентированном в направлении N-конца, взаимодействовал с мембраной сильнее и был более цитотоксичным, чем BS-РНКазы дикого типа [17]. Представленные данные в очередной раз показали важность трехмерной структуры РНКаз, особенно ориентации основных зарядов, которые влияют на цитотоксический потенциал этих ферментов.

Биназа вызывает гибель трансформированных клеток MLE-12 легочного эпителия мыши, не влияя при этом существенно на нормальные клетки АТ-II [95]. При этом спустя 24 ч инкубации биназа достигает ядра клеток АТ-II, не проявляя при этом цитотоксичности, и вызывает гибель клеток MLE-12 без проникновения в них [95]. Каким образом РНКазы опосредует свой цитотоксический потенциал без интернализации фермента? Этот вопрос долгое время оставался открытым.

Недавно мы обнаружили, что селективность биназы в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих онкоген *ras* обусловлена прямым взаимодействием РНКазы с эндогенным белком KRAS [96]. Исследование активированного KRAS с использованием негидролизующего аналога GTP (GTP γ S) показало, что биназа препятствует обмену GDP на GTP, а также снижает взаимодействие RAS с белковыми факторами GEF, SOS1. Анализ фосфорилирования

эффекторов RAS – белков АКТ и ERK1/2 – подтвердил ингибирование сигнального пути MAPK/ERK [96]. Таким образом, доказано, что селективность биназы в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих онкоген *ras*, связана с взаимодействием биназы и KRAS, которое приводит к блокированию сигнального пути MAPK/ERK и запуску апоптоза в опухолевых клетках. Связанная с KRAS биназа находится не только в димерной форме, но и в форме тримера, что подтверждает значимость агрегации фермента в олигомеры более высокого порядка для блокирования пролиферативных сигналов [96].

РНКазы А способна также влиять на клеточные сигналы, однако ее действие противоположно противоопухолевому эффекту биназы. Фермент взаимодействует с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), активируя сигнальный путь MAPK/ERK, что приводит к индукции клеточной пролиферации и росту опухоли [13]. Данная особенность РНКазы А, обнаруженная относительно недавно, ставит под сомнение возможность использования этого фермента в качестве потенциального противоопухолевого средства.

Некоторые РНКазы для проявления их цитотоксического потенциала должны проникнуть в клетку. Опубликованы противоречивые данные, касающиеся механизма интернализации РНКаз. Так, онконазы и РНКазы А интернализируются в ранние эндосомы клеток HeLa и K562 с использованием клатрин- и кавеолиннезависимых путей [87], тогда как в клетках Jurkat эндоцитоз онконазы происходит динаминзависимым путем [97]. Эти противоречивые данные предполагают, что для проникновения в клетки РНКазы могут использовать различные пути, и многие аспекты интернализации РНКаз до сих пор остаются неизвестными. BS-РНКазы интернализируются в эндосомах как нормальных, так и злокачественных клеток, но только в последних, где фермент цитотоксичен, он достигает комплекса Гольджи, обеспечивающего его цитозольную доставку [90]. Вариант BS-РНКазы, C-конец которого сконструирован для локализации в эндоплазматическом ретикулуме, не обладает цитотоксичностью, поскольку он не может высвободиться в цитозоле, чтобы проявить свою противоопухолевую активность [90].

При достижении цитозольного компартмента РНКазы встречаются с еще одним препятствием – внутриклеточным ингибитором РНКаз млекопитающих. ИР – белок с молекулярной массой 50 кДа, присутствующий в цитоплазме, митохондриях и ядре клеток животных и человека [98]. Биологические функции ИР до сих пор выяснены не до конца, рассматривается его потенциальное участие в окисли-

тельно-восстановительном гомеостазе клетки [99]. ИР блокирует действие РНКаз млекопитающих, образуя с ними плотные комплексы, ингибирующие каталитическую активность. Филогенетическая отдаленность бактериальных РНКаз и РНКаз амфибий делает их нечувствительными к действию ИР и позволяет рассматривать в качестве потенциальных противоопухолевых средств. BS-РНКазы избегают действия ИР за счет природной димеризации, образуя трехмерные структуры, недоступные для блокирования ингибитором. Причем, как указывалось ранее, лишь димеры, стабилизированные за счет обмена доменами, не подвергаются действию ИР и проявляют свою цитотоксичность [65], что еще раз подчеркивает важность олигомеризации РНКаз.

Использование гомологичных РНКаз для изучения механизма образования димеров позволило нам выявить вклад стабильности димерных структур в проявление противоопухолевого потенциала этих ферментов. Исследование цитотоксического действия бальназы и балифазы на клетки аденокарциномы легкого человека А549 показало, что наиболее выраженным апоптогенным эффектом обладает биназа, цитотоксический потенциал которой возрастает при увеличении продолжительности инкубации с клетками, тогда как активность бальназы и балифазы начинает снижаться после 48 ч инкубации [22]. Эти данные указывают на ключевую роль стабильности димерных структур в проявлении цитотоксичности ферментов. Димеры бальназы и балифазы, в отличие от биназы, имеют пониженную стабильность вследствие неспособности к обмену доменами; вероятно, через 48 ч они диссоциируют на мономеры, что приводит к снижению их токсических свойств. Димерные структуры биназы отличаются высокой

стабильностью и способны индуцировать гибель опухолевых клеток на протяжении длительного времени [22].

Представленные аргументы указывают на то, что противоопухолевая активность РНКаз является результатом сложного взаимодействия структурных и функциональных особенностей ферментов, а олигомеры РНКаз наделены большим цитотоксическим потенциалом, нежели мономеры [62, 70].

Известно, что цитотоксическое действие РНКаз обусловлено не только последствиями прямой дегградации РНК, но и регуляторными эффектами продуктов ее гидролиза [20, 86]. В проявление биологических эффектов РНКаз вносят вклад различные клеточные механизмы, включающие некаталитическое взаимодействие РНКаз с клеточными компонентами, интернализацию белков внутрь клетки, а также способность избегать действия ИР. Каждый тип цитотоксических РНКаз имеет свой специфический набор молекулярных механизмов, определяющий противоопухолевое действие фермента, однако главным среди них является структурная организация молекул РНКаз, которая вносит вклад в каждый из представленных молекулярных механизмов.

Результаты наших исследований обнаруживают прямую корреляцию между цитотоксичностью и стабильностью димерных структур РНКаз, подтверждая основополагающую роль надмолекулярной организации ферментов в проявлении их противоопухолевого действия. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 18-74-00108 в рамках программы повышения конкурентоспособности ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nucleases / Eds Linn S.M., Lloyd R.S., Roberts R.J. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1994.
2. Bechhofer D.H., Deutscher M.P. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2019. V. 54. P. 242–300.
3. Ezelle H.J., Malathi K., Hassel B.A. // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. P. 74.
4. Lee H., Lee D.G. // J. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 29. P. 1014–1021. doi:10.4014/jmb.1904.04017.
5. Ramos H.J., Souza E.M., Soares-Ramos J.R., Pedrosa F.O. // J. Biotechnol. 2006. V. 126. P. 291–294. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.04.020.
6. Olombrada M., Martínez-del-Pozo A., Medina P., Budia F., Gavilanes J.G., García-Ortega L. // Toxicon. 2014. V. 83. P. 69–74. doi:10.1016/j.toxicon.2014.02.022.
7. Rossier O., Dao J., Cianciotto N.P. // Microbiology. 2009. V. 155. P. 882–890. doi:10.1099/mic.0.023218-0.
8. Agaisse H., Gominet M., Okstad O.A., Kolstø A.B., Lereclus D. // Mol. Microbiol. 1999. V. 32. P. 1043–1053. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01419.x.
9. Шах Махмуд Р., Гарифулина К.И., Ульянова В.В., Евтюгин В.Г., Миндубаева Л.Н., Хазиева Л.Р., Дудкина Е.В., Вершинина В.И., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017. Т. 35. С. 59–64. doi:10.18821/0208-0613-2017-35-2-59-64.
10. Maksimov I.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Veselova S.V., Alekseev V.Yu., Shein M.Yu., Avalbaev A.M., Dhaware P.D., Mehete G.T., Singh B.P., Khairullin R.M. // Plants (Basel). 2019. V. 8. P. 575. doi: 10.3390/plants8120575.
11. Sassa H. // Breed Sci. 2016. V. 66. P. 116–121. doi:10.1270/jsbbs.66.116.
12. Lee H.H., Wang Y.N., Hung M.C. // Mol. Aspects Med. 2019. V. 70. P. 106–116. doi:10.1016/j.mam.2019.03.003.
13. Wang Y.N., Lee H.H., Chou C.K., Yang W.H., Wei Y., Chen C.T., Yao J., Hsu J.L., Zhu C., Ying H. // Cancer Cell. 2018. V. 33. P. 752–769. doi:10.1016/j.ccell.2018.02.012.
14. Majchrzak A., Witkowska M., Mędra A., Zwolińska M., Bogusz J., Cebula-Obrzut B., Darzynkiewicz Z., Robak T., Smolewski P. // Postepy Hig. Med. Dosw. 2013. V. 67. P. 1166–1172.

15. Wang X., Guo Z // *Oncol. Lett.* 2015. V. 9. P. 1337–1342. doi: 10.3892/ol.2014.2835.
16. Marinov I., Soucek J. // *Neoplasma.* 2000. V. 47. P. 294–298.
17. Fiorini C., Gotte G., Donnarumma F., Picone D., Donadelli M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1843. P. 976–984. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.025
18. Mitkevich V.A., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. // *Cell Cycle.* 2015. V. 14. P. 931–932.
19. Mitkevich V.A., Burnysheva K.M., Pterushanko I.Y., Adzhubei A.A., Schulga A.A., Chumakov P.M., Makarov A.A. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 72666–72675. doi: 10.18632/oncotarget.20199.
20. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. // *Bioessays.* 2008. V. 8. P. 781–790.
21. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y., Burnysheva K.M., Sosin D.V., Simonenko O.V., Ilinskaya O.N., Tchurikov N.A., Makarov A.A. // *Biochimie.* 2013. V. 95. P. 1344–1349. doi: 10.1016/j.biochi.2013.02.016.
22. Surchenko Y., Dudkina E., Nadyrova A., Ulyanova V., Zelenikhin P., Ilinskaya O. // *BioNanoScience.* 2020. https://doi.org/10.1007/s12668-020-00720-6.
23. Sevcik J., Sanishvili R.G., Pavlovsky A.G., Polyakov K.M. // *Trends Biochem. Sci.* 1990. V. 15. P. 158–162.
24. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. // *FEBS J.* 2011. V. 278. P. 3633–3643.
25. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. // *FEBS Lett.* 2003. V. 540. P. 15–20.
26. Nakamura A., Koide Y., Miyazaki H., Kitamura A., Masaki H., Beppu T., Uozumi T. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 209. P. 121–127. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17268.x.
27. Skvortsova M.A., Bocharov A.L., Yakovlev G.I., Znamenskaya L.V. // *Biochemistry (Moscow).* 2002. V. 67. P. 802–806. doi:10.1023/a:1016356926125.
28. Yoshida H. // *Methods Enzymol.* 2001. V. 341. P. 28–41.
29. Дементьев А.А., Орлов В.М., Шляпников С.В. // *Биоорганическая химия.* 1993. Т. 19. С. 853–861.
30. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O., Harwood C.R. // *Microbiol. Res.* 2015. V. 170. P. 131–138. doi:10.1016/j.micres.2014.08.005.
31. Botella E., Hübner S., Hockamp K., Hansen A., Bisicchia P., Noone D., Powell L., Salzberg L.I., Devine K.M. // *Microbiology.* 2011. V. 157. P. 2470–2484.
32. Харитонов М.А., Вершинина В.И. // *Микробиология.* 2009. Т. 78. С. 187–192.
33. Сокурченко Ю.В., Зеленихин П.В., Ульянова В.В., Колпаков А.И., Мюллер Д., Ильинская О.Н. // *Биоорганическая химия.* 2015. Т. 41. С. 37–43.
34. Jackson E.K., Mi Z., Janesko-Feldman K., Jackson T.C., Kochanek P.M. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2019. V. 316. P. R783–R790.
35. Ulyanova V., Shah Mahmud R., Dudkina E., Vershinina V., Domann E., Ilinskaya O. // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2016. V. 62. P. 181–188.
36. Leshchinskaya I.B., Kupriyanova F.G., Yakovlev G.I., Kipenskaya L.V., Ilinskaya O.N. // *Karadeniz J. Med. Sci.* 1995. V. 8. P. 218–219.
37. Ilinskaya O.N., Krylova N.I. // *PriU bioWim mikrobiol.* 1993. V. 29. P. 280–285.
38. Hartley R.W., Rogerson D.L., Jr. // *Prep. Biochem.* 1972. V. 2. P. 229–242.
39. Лещинская И.Б., Булгакова Р.Ш., Балабан Н.П., Егорова Г.С. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 1974. Т. 10. С. 242–247.
40. Dudkina E., Ulyanova V., Shah Mahmud R., Khodzhaeva V., Dao L., Vershinina V., Kolpakov A., Ilinskaya O. // *FEBS Open Bio.* 2016. V. 6. P. 24–32.
41. Sokurenko Yu., Nadyrova A., Ulyanova V., Ilinskaya O. // *BioMed Res. Int.* 2016. http://dx.doi.org/10.1155/2016/4239375.
42. Дементьев А.А., Рябченко Н.Ф., Протасевич И.И., Голышин П.Н., Степанов А.И., Орлов В.Н., Пустобаев В.Н., Макаров А.А., Моисеев Г.И., Карпейский М.Я., Шляпников С.В., Кирпичников М.П. // *Мол. биол.* 1992. Т. 26. С. 1338–1348.
43. Marianayagam N.J., Sunde M., Matthews J.M. // *Trends Biochem. Sci.* 2004. V. 29. P. 618–625.
44. Dudkina E., Kayumov A., Ulyanova V., Ilinskaya O. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e115818. doi:10.1371/journal.pone.0115818.
45. Dudkina E., Ulyanova V., Ilinskaya O. // *BioNanoScience.* 2017. V. 7. P. 127–129. https://doi.org/10.1007/s12668-016-0305-y.
46. Poliakov K.M., Goncharuk D.A., Trofimov A.A., Safonova T.N., Mit'kevich V.A., Tkach E.N., Makarov A.A., Shulga A.A. // *Mol. Biol.* 2010. V. 44. P. 922–928.
47. Polyakov K.M., Lebedev A.A., Okorokov A.L., Panov K.I., Shulga A.A., Pavlovsky A.G., Karpeisky M.Y., Dodson G.G. // *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* 2002. V. 58. P. 744–750.
48. Aphanasenko G.A., Dudkin S.M., Kaminir L.B., Leshchinskaya I.B., Severin E.S. // *FEBS Lett.* 1979. V. 97. P. 77–80.
49. Mitkevich V.A., Schulga A.A., Trofimov A.A., Dorovatovskii P.V., Goncharuk D.A., Tkach E.N., Makarov A.A., Polyakov K.M. // *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* 2003. V. 69. P. 991–996.
50. Ermakova E. // *Biophys. Chem.* 2007. V. 130. P. 26–31.
51. Breitwieser G.E. // *Circ. Res.* 2004. V. 94. P. 17–27.
52. Hirota S. // *J. Inorg. Biochem.* 2019. V. 194. P. 170–179. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.03.002.
53. Orlikowska M., Jankowska E., Kolodziejczyk R., Jaskolski M., Szymanska A // *J. Struct. Biol.* 2011. V. 173. P. 406–413. doi: 10.1016/j.jsb.2010.11.009.
54. Liu C., Sawaya M.R., Eisenberg D. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. V. 18. P. 49–55. doi: 10.1038/nsmb.1948.
55. Anfinsen C.B. // *Science.* 1973. V. 181. P. 223–230. doi: 10.1126/science.181.4096.223.
56. Bennett M.J., Schlunegger M.P., Eisenberg D. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. P. 2455–2468. doi: 10.1002/pro.5560041202.
57. Liu Y., Eisenberg D. // *Protein Sci.* 2002. V. 11. P. 1285–1299. doi: 10.1110/ps.0201402.
58. Wang L., Pang Y., Holder T., Brender J.R., Kurochkin A.V., Zudermweg E.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 98. P. 7684–7689. doi:10.1073/pnas.121069998.
59. Bennett M.J., Sawaya M.R., Eisenberg D. // *Structure.* 2006. V. 14. P. 811–824. doi: 10.1016/j.str.2006.03.011.
60. Garvie C.W., Vasanthavada K., Xiang Q. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1834. P. 1562–1571.
61. Lin R.J., Chien H.L., Lin S.Y., Chang B.L., Yu H.P. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. 3314–3326.
62. Gotte G., Mahmoud Helmy A., Ercole C., Spadaccini R., Laurents D.V., Donadelli M., Picone D. // *PLoS One.* 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0046804.
63. Zuo Y., Deutscher M.P. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 50160–50164.
64. Mathy N., Hebert A., Mervelet P., Benard L., Dorleans A., Sierra-Gallay I.L., Noirot P., Putzer H., Condon C. // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 75. P. 489–498.
65. Gotte G., Laurents D.V., Merlino A., Picone D., Spadaccini R. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 3601–3608.
66. Merlino A., Ercole C., Picone D., Pizzo E., Mazzarella L., Sica F. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 376. P. 427–437.
67. Gotte G., Libonati M. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 36670–36679.

68. Crestfield A.M., Stein W.H., Moore S. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1962. V. 1. P. 217–222.
69. Benito A., Laurents D.V., Ribo M., Vilanova M. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2008. V. 9. P. 370–393. doi: 10.2174/138920308785132695.
70. Libonati M., Gotte G. // *Biochem J.* 2004. V. 380. P. 311–327. doi: 10.1042/bj20031922.
71. Gotte G., Laurents D.V., Libonati M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1764. P. 44–54.
72. Gotte G., Bertoldi M., Libonati M. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 265. P. 680–687. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00761.x.
73. Fagagnini A., Pica A., Fasoli S., Montioli R., Donadelli M., Cordani M., Butturini E., Acquasaliente L., Picone D., Gotte G. // *Biochem. J.* 2017. V. 474. P. 3767–3781. doi: 10.1042/BCJ20170541.
74. Libonati M., Gotte G., Vottariello F. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. V. 9. P. 200–209. doi: 10.2174/138920108784567308.
75. Notomista E., Mancheno J.M., Crescenzi O., Di Donato A., Gavilanes J., D'Alessio G. // *FEBS J.* 2006. V. 273. P. 3687–3697. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05373.x.
76. Sundlass N.K., Eller C.H., Cui Q., Raines R.T. // *Biochemistry.* 2013. V. 52. P. 6304–6312. doi: 10.1021/bi400619m.
77. Shah Mahmud R., Mostafa A., Müller C., Kanrai P., Ulyanova V., Sokurenko Y., Dzieciolowski J., Kuznetsova I., Ilinskaya O., Pleschka S. // *Viol. J.* 2018. V. 15. P. 1–12. doi: 10.1186/s12985-017-0915-1.
78. Kim J.S., Soucek J., Matousek J., Raines R.T. // *Biochem. J.* 1995. V. 308. P. 547–550.
79. Rosenberg H.F. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 7876–7881.
80. Alford S., Pearson J., Carette A., Ingham R., Howard P. // *BMC Biochem.* 2009. doi: 10.1186/1471-2091-10-9.
81. Navarro S., Aleu J., Jimenez M., Boix E., Cuchillo C.M., Nogues M.V. // *Cell. Mol. Life Sci: CMLS.* 2008. V. 65. P. 324–337.
82. Sorrentino S., Libonati M. // *FEBS Lett.* 1997. V. 404. P. 1–5.
83. Blaszczyk J., Gan J., Tropea J.E., Court D.L., Waugh D.S. // *Structure.* 2004. V. 12. P. 457–466.
84. Mitkevich V.A., Tchurikov N.A., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y., Makarov A.A., Ilinskaya O.N. // *FEBS J.* 2010. V. 277. P. 186–196.
85. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V., Tchurikov N.A., Prassolov V.S., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. // *Cell Cycle.* 2011. V. 10. P. 4090–4097.
86. Ardelt B., Ardelt W., Darzynkiewicz Z. // *Cell Cycle.* 2003. V. 2. P. 22–24.
87. Haigis M.C., Raines R.T. // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. P. 313–324. doi: 10.1242/jcs.00214
88. Kanwar S.S., Kumar R. // *Enz. Eng.* 2017. doi: 10.4172/2329-6674.1000162.
89. Trevino S.R., Scholtz M., Pace C.N. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 366. P. 449–460.
90. Bracale A., Spalletti C.D., Mastronicola M.R. // *Biochem. J.* 2002. V. 362. P. 553–560.
91. Ran S., Downes A., Thorpe P.E. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 6132–6140.
92. Ilinskaya O., Decker K., Koschinski A., Dreyer F., Repp H. // *Toxicology.* 2001. V. 156. P. 101–107.
93. Ilinskaya O.N., Koschinski A., Mitkevich V.A., Repp H., Dreyer F., Pace C.N., Makarov A.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 314. P. 550–554.
94. Futami J., Yamada H. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. V. 9. P. 180–184. doi: 10.2174/138920108784567326.
95. Cabrera-Fuentes H.A., Kalacheva N.V., Mukhametshina R.T., Zelenichin P.V., Kolpakov A.I., Barreto G., Praissner K.T., Ilinskaya O.N. // *Biomed. Khim.* 2012. V. 58. P. 272–280.
96. Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E.V., Ulyanova V.V., Kayumov A., Barreto G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1863. P. 1559–1567.
97. Rodriguez M., Torrent G., Bosch M., Rayne F., Dubremetz J.F., Ribó M., Benito A., Vilanova M., Beaumelle B. // *J. Cell Sci.* 2007. V. 120. P. 1405–1411. doi: 10.1242/jcs.03427.
98. Furia A., Moscato M., Cali G., Pizzo E., Confalone E., Amoroso M.R., Esposito F., Nitsch L., D'Alessio G. // *FEBS Lett.* 2011. V. 585. P. 613–617. doi: 10.1016/j.febslet.2011.01.034.
99. Monti D.M., Montesano G.N., Matousek J., Esposito F., D'Alessio G. // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. P. 930–934. doi: 10.1016/j.febslet.2007.01.072.

УДК 579.61

Разработка методов антимикробной терапии, преодолевающих антибиотикорезистентность *Acinetobacter baumannii*

О. В. Кисиль¹, Т. А. Ефименко^{1*}, Н. И. Габриэлян², О. В. Ефременкова¹¹Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия²Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123182 Россия

*E-mail: efimen@inbox.ru

Поступила в редакцию 07.04.2020

Принята к печати 19.05.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10955

РЕФЕРАТ Распространение антибиотикорезистентности среди патогенных микроорганизмов представляет глобальную угрозу для здоровья человека. В 2017 году Всемирная организация здравоохранения опубликовала список из 12 приоритетных антибиотикоустойчивых патогенных бактерий, в отношении которых необходимо разработать новые эффективные антибиотики или новые способы лечения вызываемых ими инфекций. Один из таких патогенов – *Acinetobacter baumannii*, рассматриваемый в настоящем обзоре. Бактерия *A. baumannii* – один из самых часто выявляемых инфекционных агентов во всем мире, клинически значимыми особенностями которого являются устойчивость к обработке дезинфицирующими средствами и ультрафиолетом, высушиванию, а также резистентность к различным классам антибиотиков. В представленном обзоре описаны попытки преодоления лекарственной устойчивости *A. baumannii* без применения антибиотиков. Рассмотрен потенциал применения бактериофагов и антимикробных пептидов при инфекциях, вызванных *A. baumannii* как в планктонной, так и в биопленочной форме. Обсуждаются исследования в области разработки вакцин на основе белков внешней мембраны *A. baumannii*, применения наночастиц серебра, фотодинамической и хелатной терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Acinetobacter baumannii*, множественная лекарственная устойчивость, биопленки, бактериофаговая терапия, антимикробные пептиды.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.; МПК – минимальная подавляющая концентрация.

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотикотерапия – одно из важнейших достижений медицины 20 века, позволившее спасти миллионы жизней. Однако нельзя не отметить и недостатки антибиотикотерапии, а именно, ту или иную степень токсичности, нарушение микробиома, а также образование резистентных форм патогенов, вызывающих тяжелые инфекционные заболевания. Их быстрое распространение ставит под угрозу результативность современной медицины, включая хирургические вмешательства, трансплантацию органов, гематологические заболевания, при которых у пациентов ослабевает иммунитет и соответственно повышает-

ся вероятность заражения. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) *Acinetobacter baumannii* входит в число шести особо опасных бактерий, поскольку обладает множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и не поддается антибиотикотерапии. Для этих видов ВОЗ была предложена аббревиатура ESKAPE (созвучная английскому слову «escape» – ускользать, т.е. ускользать от действия антибиотиков): *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp. [1]. Через 8 лет список бактериальных патогенов, не поддающихся антимикробной

терапии, был расширен до 12 и разделен на три группы по уровню опасности для здоровья человека (критический, высокий и средний), в отношении которых необходимо разработать новые эффективные антибиотики или новые способы лечения вызываемых ими инфекций [2].

В многочисленных работах, опубликованных к настоящему времени, предложены различные варианты антимикробной терапии, эффективной при инфекциях, вызванных устойчивыми патогенами [3]. Данный обзор концентрируется исключительно на устойчивых к антибиотикам штаммах грамотрицательного патогена *A. baumannii* и ставит своей целью описать альтернативные подходы к лечению инфекций, вызванных *A. baumannii*, включая бактериофаговую терапию, профилактическую вакцинацию, световую терапию, терапию ионами серебра и хелатную терапию.

Род *Acinetobacter* включает грамотрицательные, строго аэробные, лактозоферментирующие, неподвижные бактерии палочковидной формы. Представители рода *Acinetobacter* являются повсеместно распространенными сапрофитными микроорганизмами. Они могут быть выделены из разных источников – почвы, поверхностных вод, слизистых оболочек верхних дыхательных путей людей. В настоящее время род *Acinetobacter* включает 27 видов. С клинической точки зрения наибольший интерес вызывают три филогенетически родственных вида *Acinetobacter*: *A. baumannii*, *A. pittii* и *A. nosocomialis*. Именно они являются наиболее значимыми патогенами, вызывающими внутрибольничные инфекции [4]. К важным приспособительным признакам *A. baumannii* относится высокая частота мутаций, приводящая к быстрому развитию антибиотикорезистентности. На рис. 1 показаны временные интервалы между введением антибиотика в медицинскую практику и установлением резистентности *A. baumannii* к этому антибиотику [5].

Предположительно впервые инфекции, вызванные *A. baumannii*, были зафиксированы на военных очистных сооружениях США во время войны в Ираке и Афганистане [6, 7]. Бактерия *A. baumannii* даже получила название «Иракибактер», так как от нее пострадали тысячи американских солдат во время войны в Ираке [8]. Первые исследования вспышек внутрибольничных инфекций, вызванных *A. baumannii*, провели в начале 1980-х годов [9, 10]. Интересно отметить, что 30 лет назад инфекции, вызываемые представителями *Acinetobacter*, не считались проблемой общественного здравоохранения, при том что у *A. baumannii* изначально были зафиксированы и описаны механизмы врожденной резистентности. Однако, как показывают исследо-



Рис. 1. Временные интервалы между введением антибиотика и первым сообщением о резистентности у *Acinetobacter baumannii* [5]

вания последнего десятилетия, в дополнение к собственным внутренним механизмам резистентности *A. baumannii* может за счет горизонтального переноса генов успешно приобретать множественные детерминанты устойчивости, становясь бактерией с МЛУ. Сегодня штаммы *A. baumannii* с МЛУ распространены в больницах по всему миру как эндемически, так и эпидемически, с уровнем смертности в диапазоне от 40 до 70% при искусственной вентиляции легких, 25–30% при менингите и 34–49% при бактериемии [11]. Изучение распространенности инфекций в отделениях интенсивной терапии, проведенное в 75 странах пяти континентов, позволяет считать *A. baumannii* одним из самых распространенных инфекционных агентов в мире [12]. На сегодняшний день по оценке ВОЗ распространение *A. baumannii* с МЛУ представляет серьезную глобальную угрозу. В табл. 1 отмечены основные этапы утверждения *A. baumannii* в роли нозокомиального патогена с множественной лекарственной устойчивостью.

Секвенирование геномов 49 штаммов *A. baumannii* с МЛУ в рамках одной больничной системы США показало уникальность практически каждого проанализированного штамма [25]. Сравнительный анализ штаммов *A. baumannii* выявил перенос мобильных генетических элементов, гомологичную рекомбинацию в пределах всего генома, делеции и мутации – и все это в течение коротких промежутков времени. Вариации штаммов по составу генов не имели четких пространственных (местоположение в больнице) или временных закономерностей, что доказывает существование в данной больнице пула циркулирующих штаммов со значительным взаимодействием друг с другом. Таким образом, обмен генетическим

Таблица 1. *Acinetobacter baumannii*, история изучения

Год	Событие	Ссылка
1911	Впервые описан род <i>Acinetobacter</i>	[13]
1968	Принято современное обозначение рода <i>Acinetobacter</i> (с греч. <i>akinetos</i> – неподвижный), предложенное Brisou и Prevot в 1954 г.	[14, 15]
1974	Обозначение рода включено в «Определитель Bergey» (описан как имеющий только один вид: <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>)	[16]
1984	Первое сообщение об устойчивости к имипенему	[17]
1986	Комплекс <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> подразделен на четыре вида на основании исследований гибридизации ДНК: <i>A. calcoaceticus</i> ; <i>A. baumannii</i> ; <i>A. pittii</i> ; <i>A. nosocomialis</i> <i>A. baumannii</i> описан как возбудитель внутрибольничных инфекций	[18]
1999	Первое сообщение об устойчивости к колистину	[19]
2001	ВОЗ публикует первый международный призыв: «Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам»	[20]
2007	Первое сообщение об устойчивости к тигециклину	[21]
2009	Группу бактерий, опасных для здоровья человека, объединяют в ESKAPE (включая <i>Acinetobacter</i>)	[1]
	США (CDC) и ЕС (ECDC) создают трансатлантическую целевую группу по устойчивости к противомикробным препаратам (TAFTAR)	[22]
2015	ВОЗ разрабатывает новый «Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам»	[23]
2017	ВОЗ публикует «Глобальный приоритетный список антибиотикорезистентных бактерий для руководства исследованием, открытием и разработкой новых антибиотиков»	[24]

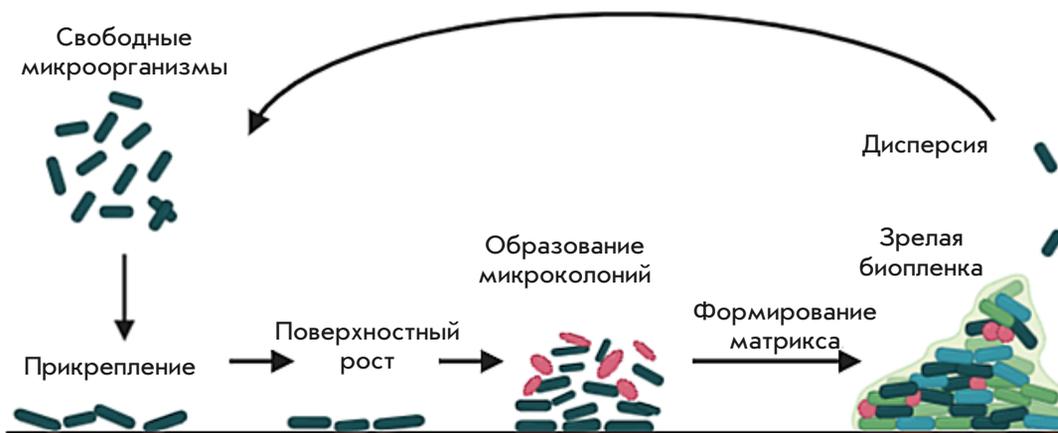


Рис. 2. Этапы формирования биопленки

материалом и перестройки бактериального генома приводят к множественным генетическим комбинациям и обеспечивают бесконечный источник генетической адаптивности *A. baumannii*.

Успеху выживаемости *A. baumannii* в качестве внутрибольничного патогена способствует не только возможность «переключать» свою геномную структуру, улавливая маркеры устойчивости, но также врожденная способность к образованию биопленок [11]. В отличие от планктонного состояния биопленки представляют собой сообщества бактерий, заключенные в самопродуцируемый экзополисахаридный матрикс, который служит для прикрепления бактерий к поверхностям, включая медицинские имплантаты и ткани человека: зубы, кожу, трахею, мочеиспускательный канал. Известно, что бактерии в био-

пленке могут быть в 10–1000 раз более устойчивы к антибиотикам, чем их планктонные формы [26]. Инфекции, связанные с образованием прикрепленной к поверхностям биопленки, очень трудно лечить. Поэтому предотвращение ранней стадии формирования биопленки считается важным этапом лечения/предупреждения инфекции.

Формирование биопленки является поэтапным процессом, который включает три фазы: адгезию, созревание и рассеивание (рис. 2). В фазе адгезии планктонные клетки прикрепляются к поверхности посредством слабых взаимодействий [27]. После первичного прикрепления слабо связанные клетки стабильно прикрепляются за счет более специфических молекулярных взаимодействий между бактериальными поверхностными структурами, такими,

как пили, и молекулами хозяина, которые функционируют как рецепторы (например, фибронектин). В фазе созревания биопленки бактерии производят большое количество экзополисахаридов, которые формируют большую часть биомассы биопленки. В фазе рассеивания клетки (единичные или кластеры) отделяются для колонизации соседних мест. Биопленка обладает высокой устойчивостью к лекарственным препаратам из-за низкой диффузии в нее антибиотиков, наличие персистирующих клеток, медленным темпам роста и низкому метаболизму клеток, которые существуют глубоко в биопленке. Биопленке свойственно увеличение горизонтальной передачи генов устойчивости (из-за близости клеток). Доказано, что *A. baumannii* обладает способностью прикрепляться к тканям и формировать биопленку в местах хирургического вмешательства, это осложняет профилактику и лечение инфекции, оно особенно критично при применении медицинских имплантатов [28].

Во время вспышек внутрибольничных инфекций изоляты *A. baumannii* были обнаружены на различных поверхностях, окружающих пациентов, включая мебель и больничное оборудование, двери, выключатели, умывальники и т.д., – более 30 наименований [11]. Следует отметить, что вспышки инфекции, связанные с зараженными предметами, исчезают после того, как источник заражения удаляют, меняют или надлежащим образом дезинфицируют. На сегодняшний день правильная гигиена, в частности гигиена рук, является эффективным и простым методом предупреждения бактериальной инфекции независимо от ее природы.

Механизм заражения *A. baumannii* связан с рядом факторов, к которым относят: длительное пребывание в больнице (особенно в реанимационных отделениях); тяжесть заболевания; процедуры переливания крови; использование внутрисосудистого катетера или эндотрахеальной трубки; интубацию при искусственной вентиляции легких; неадекватную начальную антибактериальную терапию и загрязнение *A. baumannii* окружающей больного среды. Загрязненные поверхности, медицинское оборудование и/или плохая гигиена рук и нарушение санитарных требований пациентами и медицинским персоналом могут служить резервуарами или быть причиной быстрой передачи инфекционного агента, при которых медицинский персонал выступает в качестве средства доставки микроорганизмов к пациентам или способствует их обмену между пациентами [29]. *A. baumannii* передается от человека к человеку воздушно-капельным путем, поэтому дыхательная система является основным путем заражения. S. Kotay и соавт. обнаружили, что бактерии могут

распространяться также через раковины для мытья рук [30]. Показано, что бактерии размножаются в водосточных трубах в виде биопленки и постепенно занимают пространство выше по трубе по направлению к раковине. Потоки воды из крана вызывают рассеивание капель, с которыми распространяются бактерии.

Заболевания, вызванные *A. baumannii*, не отличаются какими-то особыми клиническими проявлениями от других инфекций. Тем не менее, некоторые специфические особенности могут помочь врачам предположить инфицирование именно *A. baumannii*, такие, как: (1) позднее проявление инфекции и (2) чрезмерное применение антибиотиков широкого спектра на первых этапах лечения. Необоснованное применение антибиотиков считается основной причиной появления значительной доли вариантов *A. baumannii* с МЛУ [31]. Неоднократно показано, что использование антибиотиков в концентрациях ниже МПК приводит к повышению вероятности формирования капсул/биопленок *A. baumannii* [32].

Эффективность противомикробных препаратов в отношении грамотрицательных бактерий зависит от баланса нескольких фундаментальных молекулярных внутриклеточных процессов, которые происходят до взаимодействия противомикробного препарата с мишенью: (1) притока лекарственных средств, опосредованного поринами, (2) оттока, опосредованного эффлюксными системами, (3) инактивации препарата, обычно путем необратимого расщепления, катализируемого периплазматическими и цитоплазматическими ферментами, и (4) модификации мишени, с которой может связываться препарат [33]. Высокая устойчивость *A. baumannii* к противомикробным препаратам обусловлена взаимосвязью всех перечисленных механизмов и достигается при помощи получения новой генетической информации посредством горизонтального переноса генов и мутаций. Приобретение новых генетических детерминант штаммами *A. baumannii* происходит за счет комбинированного воздействия мобильных генетических элементов (инсерционные последовательности, транспозоны), интегронов и переносимых плазмид. Изменения могут быть вызваны либо спонтанными мутациями, приводящими к модификации мишени лекарства, либо инсерциями/делециями подвижных элементов, изменяющими экспрессию механизмов эндогенной устойчивости или проницаемость мембран. В дополнение к перечисленным механизмам *A. baumannii* может накапливать множество детерминант устойчивости в так называемых «островках устойчивости» – специфических областях генома, которые содержат кластеры горизонтально перенесенной ДНК, включающие гены устойчивости

к противомикробным препаратам. Такие кластеры обеспечивают безопасное «убежище» для мобильных элементов, так как вставка в этом сайте не вызывает каких-либо повреждений клетки-хозяина [34, 35]. Предполагается, что *Acinetobacter* spp. может играть важную роль в передаче генов устойчивости другим грамотрицательным микроорганизмам [36].

Тридцать лет назад инфекции, вызванные *A. baumannii*, можно было эффективно лечить с помощью традиционных антибиотиков, однако глобальное распространение штаммов с МЛУ резко сократило количество средств, эффективных при инфекциях, вызванных данным патогеном. На сегодняшний день установлено, что *A. baumannii* обладает устойчивостью к таким антибиотикам, как аминопенициллины, цефалоспорины, хлорамфеникол, а также аминогликозиды, фторхинолоны и тетрациклины широкого спектра действия [29]. Множественная лекарственная устойчивость многих клинических изолятов *A. baumannii* серьезно ограничивает доступные современные варианты лечения, поэтому существует острая потребность в новых терапевтических средствах и способах, эффективных в отношении *A. baumannii* с МЛУ.

В последние годы при инфекциях, вызванных грамотрицательными бактериями с МЛУ, все чаще применяют комбинированную терапию. Очевидно, что вероятность возникновения резистентности против комбинации двух препаратов намного меньше, чем против одного. Кроме того, синергический эффект комбинированных антибиотиков превышает эффект от применения отдельных антибиотиков. Однако некоторые комбинации вызывают противоположный эффект, что приводит к гораздо более серьезным повреждениям. Один антибиотик может индуцировать механизм устойчивости ко второму антибиотику, вводимому в комбинации, что приводит к антагонистическому эффекту [3].

Хорошие перспективы для использования в клинической антибактериальной практике имеют адъюванты. Сами по себе эти вещества практически не обладают антимикробной активностью, но в сочетании с антибиотиками адъюванты способны ингибировать механизмы резистентности различными способами: (1) путем увеличения поглощения антибиотика через бактериальную мембрану, (2) блокированием эффлюксных насосов, (3) изменением физиологии устойчивых клеток, способствующей распространению биопленок, в частности, путем гашения чувства кворума [37]. Известно, что бактерии вырабатывают химические сигналы, необходимые для межклеточной коммуникации и адаптации к окружающей среде. Механизм чувства кворума («кворум сенсинг») у бактерий заключается в экспрессии определенного

фенотипа при достижении высокой плотности популяции [38]. Молекулы, ингибирующие чувство кворума, подавляют фенотипическое проявление признака, например образование биопленки. Так действует 1-[(2,4-дихлорфенетил)амино]-3-феноксипропан-2-ол, комбинации которого с различными антибиотиками подавляют рост всех патогенов группы ESKAPE как в планктонной, так и в биопленочной форме [39].

Общее количество антибиотиков, эффективных при грамотрицательных инфекциях, уменьшается с каждым годом. В XXI веке в медицинскую практику внедрено всего 33 антимикробных препарата, из них только два новых природных антибиотика – даптомицин и фидаксомицин [40]. Анализ списков антибиотиков, рекомендованных Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI, США), показал, что, начиная с 2010 года, многие антибиотики, предложенные для лечения инфекций, связанных с ESKAPE, были заменены относительно небольшим количеством комбинаций антибиотик + антибиотик [3]. Таким образом, в связи с ограниченной возможностью применения антибиотиков при инфекциях, вызванных грамотрицательными бактериями с МЛУ, существует необходимость поиска альтернативных стратегий. Среди них выделяют такие методы, как применение бактериофагов и их ферментов, антимикробных пептидов, фотодинамической и хелатной терапии, наночастиц.

БАКТЕРИОФАГОВАЯ ТЕРАПИЯ

Одним из возможных терапевтических средств против *A. baumannii* являются бактериофаги – самые распространенные на планете организмы, число которых по ряду оценок превосходит 10^{31} [41]. Фундаментальный аспект взаимодействия фаг–бактерия – специфичность фага, т.е. способность инфицировать строго определенную бактерию–хозяина. Бактериофаги адсорбируются на клеточной стенке бактерий, вводят свой геном через мембрану в клетку, за счет которой экспрессируют собственные гены, реплицируют геном в клетке–хозяине и высвобождают сформировавшиеся вирионы после лизиса бактериальных клеток. К преимуществам бактериофаговой терапии по сравнению с антибиотикотерапией относятся лекарственная переносимость и более низкие темпы возникновения резистентности бактерий к бактериофагам. Кроме того, бактериофаги высоко специфичны к своим мишеням, в отличие от антибиотиков широкого спектра действия, которые убивают нормальную бактериальную флору и нарушают микробиом здорового человека [42].

По мере того как повышается заболеваемость и смертность от патогенов с МЛУ, во всем мире возвращается интерес к бактериофагам. Начиная с 2010

Таблица 2. Обобщенные данные применения бактериофагов

Антимикробный агент	Модель инфекции	Эффективность подавления инфекции	Антибиопленочная активность	Источник
WCHABP1, WCHABP12	Инфицированные личинки <i>Galleria mellonella</i>	Выживаемость личинок <i>Galleria mellonella</i> увеличилась до 75%	*	[47]
Фаг (без обозначения, вероятно, принадлежит к семейству <i>Siphoviridae</i>)	Раневая инфекция у крыс	100% подавление патогена	*	[48]
Коктейль из АВ-Army1 и АВ-Navy1-4	Раневая инфекция у мышей	Подавление патогена	▲	[49]
Коктейли из АВ-Navy1, АВ-Navy4, АВ-Navy71, АВ-Navy97 и AbTP3Ф1	Псевдокиста поджелудочной железы человека	100% подавление патогена	*	[50]

Примечание: «*» – нет данных; «▲» – разрушение биопленки.

года учеными разных стран обнаружены новые бактериофаги, инфицирующие *A. baumannii* с МЛУ [43–46]. В большинстве случаев бактериофаги против *A. baumannii* изучали *in vitro*, однако в последние годы способность бактериофагов лизировать *A. baumannii* все чаще оценивают путем моделирования инфекционного процесса у животных. В табл. 2 обобщены результаты бактериофаговой терапии инфекций, вызванных *A. baumannii*, за последние 5 лет. Так, показано, что два литических бактериофага, выделенных из сточных вод больницы, смогли инфицировать более 50% карбапенем-устойчивых клинических штаммов *A. baumannii*. Менее 20% личинок *Galleria mellonella* выжили через 96 ч после инфицирования *A. baumannii*. При введении бактериофагов выживаемость личинок увеличилась до 75%, в то время как лечение полимиксином В повысило выживаемость только до 25% [47]. Выявлено также улучшение заживления раневой инфекции в группе, зараженной фагом, и значительное снижение смертности у крыс по сравнению с инфицированными животными, получавшими антибиотик [48].

Коктейль из бактериофагов успешно использовали в борьбе с *A. baumannii* на модели раневой инфекции у мышей: наблюдали снижение бактериальной нагрузки в ране, предотвращение распространения инфекции и некроза окружающих тканей [49]. Показано, что бактериофаги в коктейле функционируют комбинированным образом: действие одного из них направлено на перевод популяции *A. baumannii* из пленочного в планктонное состояние, в котором клетки чувствительны к другим бактериофагам в смеси. Хотя отдельные бактериофаги в этой работе обладали некоторыми антибактериальными свойствами, но они не были такими эффективными, как комплексный коктейль бактериофагов [49]. Следует отметить, что тестирование коктейля бактериофагов против коллекции из 92 клинических изолятов *A. baumannii*

с МЛУ выявило восприимчивость к терапии только 10 штаммов – это подчеркивает узкий спектр действия фагов, что необходимо учитывать при использовании фагов в качестве терапевтического средства. При составлении коктейля бактериофагов оптимально использовать бактериофаги, принадлежащие к разным семействам и обладающие широким спектром хозяев – разных изолятов *A. baumannii*.

Коктейль бактериофагов успешно применяли в терапии больного диабетом и некротическим панкреатитом, осложненным *A. baumannii* с МЛУ [50]. Несмотря на многочисленные курсы антибиотиков (комбинация меропенема, тигециклина и колистина), состояние 68-летнего пациента ухудшалось в течение 4-месячного лечения. Из-за неэффективности антибиотикотерапии были составлены три фаговых коктейля с литической активностью против *A. baumannii*. Введение их внутривенно и подкожно в полость абсцесса привело к полному излечению пациента. Следует отметить, что в ходе лечения появились серийные изоляты *A. baumannii* с существенно сниженной чувствительностью к введенным фагам, т.е. популяция *A. baumannii* стала эволюционировать в ответ на селекционное давление, оказываемое фагами. Это совпадает с данными [51], согласно которым в процессе применения литических бактериофагов некоторые клетки *A. baumannii* могут приобрести резистентность и избежать лизиса бактериофагами. Бактериофаг теряет способность эффективно инфицировать своего хозяина, если рецепторы становятся недоступными, например из-за образования биопленки, которая препятствует доступу бактериофагов к поверхности клетки-хозяина. Несмотря на то что коктейль бактериофагов потерял антибактериальную активность, оказалось, что он предотвращает рост *A. baumannii* с повышенной устойчивостью к миноциклину [50]. Этот антибиотик был добавлен к терапии бактериофагом через 4 дня после

первоначального введения коктейля. Комбинаторная активность между бактериофагами и традиционными антибиотиками показана ранее на животных моделях [49]. Очевидно, перевод популяции *A. baumannii* в некапсулированное состояние приводит к тому, что антибиотики могут легче проникать через внешнюю мембрану бактерий. Таким образом, в дополнение к потенциальному терапевтическому применению бактериофаги можно использовать для разрушения/удаления биопленок *A. baumannii*. При этом комбинация фагов с антибиотиками создает ситуацию, в которой уничтожение бактерий будет обеспечено либо бактериофагом, либо антибиотиком, либо их совместным действием.

Считается, что бактериофаги могут способствовать передаче генетических элементов, обуславливающих лекарственную устойчивость и патогенность бактерий, однако, при культивировании на бактериальном изоляте, уже присутствующем у пациента, риск введения экзогенной генетической информации, обеспечивающей повышенную вирулентность или устойчивость к антибиотикам, сводится к минимуму. Кроме того, природная специфичность бактериофага к виду бактерии и даже к штамму сводит к минимуму потенциал горизонтального переноса генов по сравнению с более беспорядочной конъюгацией плазмиды или поглощением экзогенной ДНК в естественно трансформируемых бактериях.

Многочисленные успехи в лечении инфекций, вызванных вариантами *A. baumannii* с МЛУ, путем местного и системного введения разнообразных бактериофагов, в том числе совместно с антибиотиками, еще раз подчеркивают потенциал бактериофагов при бактериальных инфекциях. Однако терапию бактериофагом трудно стандартизировать для массового производства и хранения. Кроме того, полные геномы бактериофагов содержат некоторые гены с неизвестными функциями, что затрудняет прогнозирование долгосрочной безопасности бактериофагов [52].

Процесс адсорбции фага на восприимчивой клетке-хозяине определяется специфическим взаимодействием между рецепторсвязывающими белками фага, находящимися на хвостовых фибриллах (с или без ферментативной активности), и специфическим рецептором на поверхности клетки. Известно, что деполимеразы полисахаридов – ферменты, ответственные за частичное разрушение полисахаридов клеточной стенки бактерии, являются распространенными составляющими шипов и фибрилл бактериофагов. Разрушение бактериальной капсулы уменьшает образование биопленки и снижает устойчивость к антибиотикам, поэтому было предложено использовать деполимеразы бактериофагов для разрушения биопленки при лечении бактериальных

инфекций [53–55]. Показано, что различные фаги, выделенные против *A. baumannii*, кодируют деполимеразу, которая успешно разрушает капсульный экзополисахарид бактерии [53, 56, 57]. Так, эндолизин (LysAB3) бактериофага ФАВ3, специфичного к *A. baumannii*, эффективно разрушает бактериальную биопленку и связанную с биопленкой *A. baumannii in vitro* [58]. Антибактериальный механизм LysAB3 может быть связан со способностью структурной области амфифильного пептида усиливать проницаемость цитоплазматической мембраны *A. baumannii* путем деградации пептидогликана бактериальной стенки.

Бактериофаги, заражающие виды *Acinetobacter*, обычно обладают высокой специфичностью к штамму-хозяину [59]. С точки зрения терапевтического применения высокая специфичность бактериофагов может рассматриваться как полезный, так и ограничивающий фактор. Однако если гены, кодирующие белок хвостовой фибриллы бактериофага, заменить генами других фагов, то новый химерный фаг утратит чувствительность к исходным хозяевам и сможет лизировать клетки новых хозяев. Так, химерный фаг ФАВ1tf6, полученный путем замены гена, кодирующего белок хвостовой фибриллы фага ФАВ1, на соответствующий ген из ФАВ6, приобрел диапазон хозяев второго бактериофага [53].

Белки хвостовых шипов бактериофагов могут использоваться в качестве инструмента биоинженерии для получения гликоконъюгатной вакцины против *A. baumannii* [53, 60, 61]. Гликоконъюгатные вакцины получают путем конъюгации антибактериального экзополисахарида с белком-носителем. Известно, что вакцина на основе олигосахаридных фрагментов вызывает более сильную иммунную реакцию, чем вакцина на основе цельных бактериальных экзополисахаридов из-за неоднородности последних. Поскольку химический синтез полисахаридов трудоемок и имеет низкий выход, а химический гидролиз бактериальных экзополисахаридов приводит к образованию смеси гетерогенных олигосахаридных фрагментов, то использование белков хвостовых шипов фага, способных гидролизовать экзополисахарид бактерий, выступает в качестве возможной альтернативы получению олигосахаридов заданного размера. Показано, что белок хвостового шипа бактериофага ФАВ6 способен деполимеризовать экзополисахарид штамма *A. baumannii* 54149 с образованием гомогенных олигосахаридных фрагментов, которые могут служить основой для получения гликоконъюгатной вакцины [60, 61].

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ВАКЦИНАЦИЯ

Одним из альтернативных способов борьбы с бактериальными инфекциями может стать профи-

лактическая вакцинация [62]. Классическая вакцина – это фармацевтический продукт, который стимулирует иммунную систему, предотвращая развитие патогенных микроорганизмов. Чтобы вызвать длительный иммунный ответ, включающий как врожденную, так и адаптивную иммунную системы, вакцина должна напоминать патоген, но при этом не вызывать сопутствующего заболевания. В первых работах, направленных на разработку вакцин против *A. baumannii*, предполагалось включение в вакцину множества бактериальных антигенов. Считалось, что вакцины на основе цельных клеток могут стимулировать ответ против множества антигенов, что обеспечит защиту от широкого спектра штаммов в пределах вида. Так, в качестве антигена успешно использовали везикулы наружной мембраны *A. baumannii* [63]. Инактивированная цельноклеточная вакцина успешно защищала мышей от двух клинических изолятов *A. baumannii*, в том числе от резистентного штамма. Позднее для разработки вакцины стали использовать отдельные бактериальные компоненты. На модели внутрибрюшинной инфекции *A. baumannii* у мышей установлено, что вакцинация специфическим белком клеточной поверхности, вовлеченным в формирование биопленки *A. baumannii*, снижает бактериальную нагрузку в тканях и приводит к образованию высоких титров антител [64].

Показано, что белки внешней мембраны *A. baumannii* OmpA, Omp34 kDa и OmpC эффективны для разработки противобактериальной вакцины. Создана ДНК-вакцина, состоящая из плазмид, кодирующих два белка наружной мембраны *A. baumannii*, OmpA и Pal [65]. Белок OmpA считается наиболее перспективным антигеном для разработки вакцин против *A. baumannii*, так как он является фактором вирулентности, участвующим в патогенезе *A. baumannii*, и проявляет высокую иммуногенность на животных моделях. Кроме того, OmpA высоко консервативен среди различных штаммов, это наиболее распространенный белок, идентифицированный в везикулах наружной мембраны *A. baumannii*. Pal – пептидогликан-ассоциированный липопротеин клеточной оболочки, играет важную роль в обеспечении целостности внешней мембраны. На мышинной модели пневмонии показана значительная эффективность ДНК-вакцины против острой инфекции *A. baumannii*; при иммунизации мышей, зараженных клиническими штаммами *A. baumannii*, наблюдалась эффективная перекрестная защита.

Профилактическая вакцинация и пассивная иммунизация могут быть весьма эффективными для профилактики и лечения наиболее распространенных и серьезных инфекций, вызванных *A. baumannii*. Однако лишь немногие из вакцин, испытан-

ных на животных, были включены в клинические исследования, и пока ни одна вакцина против *A. baumannii* не разрешена для иммунизации людей. Кроме того, открытым остается вопрос, какие группы населения получают пользу от профилактической вакцинации против *A. baumannii* и когда они должны быть вакцинированы?

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ

Антимикробные пептиды (АМП) соответствуют определению «антибиотики», они образуются живыми организмами и проявляют антибиотическое действие в отношении патогенных микроорганизмов. Одним из первых из слез и слюны человека выделили лизоцим, открытый Александром Флемингом в 1920-е годы. В 1939 году на заре науки об антибиотиках были описаны грамицидины, пептидные антибиотики бациллярного происхождения. В настоящее время АМП обнаружены у организмов всех таксономических групп. У большинства многоклеточных организмов АМП являются ключевым элементом неспецифической врожденной системы защиты, они входят в первую линию обороны от вторжения широкого спектра патогенных микроорганизмов [66–68]. В данном обзоре рассмотрена особая группа антимикробных пептидов, а именно, образующихся в организме человека и животных. Эти АМП также соответствуют определению – «гуморальные факторы врожденного иммунитета» [69].

Природные антимикробные пептиды обычно состоят из 12–60 аминокислотных остатков и содержат катионные аминокислоты, как правило, остатки аргинина и лизина. Это позволяет АМП взаимодействовать с отрицательно заряженными бактериальными мембранами, а в некоторых случаях даже проникать через них – транслоцироваться в клетки-хозяева, благодаря большому градиенту электрического потенциала, что приводит к лизису бактериальной клетки [70]. Помимо разрушения мембран, АМП могут вмешиваться во внутриклеточные процессы, предотвращая биосинтез нуклеиновых кислот, белков и клеточных стенок. Кроме бактериальной мембраны, мишенями для АМП могут служить пептидогликаны клеточной стенки, цитозольные РНК, белки или цитозольные ферменты/шапероны [71].

В настоящее время многие АМП высших организмов проходят клинические испытания в качестве потенциальных новых антимикробных лекарственных средств или в качестве дополнения к существующим антибиотикам в схемах лечения инфекционных заболеваний [72]. В табл. 3 суммированы результаты изучения способности АМП подавлять инфекции, вызванные *A. baumannii*. Показано, что гистатин 5 (Hst 5), богатый гистицином АМП, выделенный

Таблица 3. Обобщенные данные применения антимикробных пептидов

Антимикробный агент	Модель инфекции	Эффективность подавления инфекции	Антибиопленочная активность	Источник
Hst 5 (П)	<i>in vitro</i>	85–90% подавление патогена	–	[73]
LL37 (П), WLBU2 (С)	<i>in vitro</i>	Подавление патогена	Δ	[28]
1018 (П)	<i>in vitro</i>	Подавление патогена	▲, Δ	[74]
НВсARD-150-177С (М)	Инфекция легких у мышей	Выживаемость мышей увеличилась до 62.5–80%	*	[75]
SAAP-148 (С)	Раневая инфекция мышей, <i>ex vivo</i> раневая инфекция кожи человека	100% подавление патогена	▲, Δ	[76]
K11 (С)	Раневая инфекция у мышей	99% подавление патогена	*	[77]
N10 (С), NB2 (С)	<i>in vitro</i>	Подавление патогена	▲	[79]

Примечание: «П» – природный АМП; «М» – модификация природного АМП; «С» – синтетический АМП; «–» – нет активности; «*» – нет данных; «▲» – разрушение биопленки, «Δ» – предотвращение образования биопленки.

из слюны человека и высших приматов, проявляет сильную бактерицидную активность в отношении патогенов ESKAPE [73]. Действие данного АМП вызвало гибель 85–90% клеток *A. baumannii*, при этом Hst 5 не показал значимой антибиопленочной активности в отношении *A. baumannii*. Установлено, что конъюгация Hst 5 со спермидином приводит к усилению бактерицидной активности пептида против *A. baumannii*. Опубликованы также результаты тестирования природного пептида 1018, который запускает деградацию важного сигнального нуклеотида (p)ppGpp [74]. Обработка пептидом 1018 в концентрациях, не влияющих на рост планктонных клеток, полностью предотвращала образование биопленки и приводила к уничтожению зрелых биопленок у репрезентативных штаммов как грамположительных, так и грамотрицательных патогенов, включая *A. baumannii*. Низкие концентрации пептида 1018 приводили к рассеиванию биопленки, более высокие – вызывали гибель клеток биопленки. Таким образом, распознавание и рассеивание бактериальных мембран (без уничтожения бактерий) могут мешать прикреплению бактерий к поверхностям (например, медицинским имплантатам или местам хирургического вмешательства) и способствовать успеху антимикробной терапии.

Помимо природных АМП, предложены синтетические производные с улучшенной активностью, в разработке которых в качестве эталонного шаблона использовали природные АМП. Показано, что химерные АМП, созданные из двух различных АМП, улучшают антимикробную активность. Другие успешные примеры модификации АМП включают замены на D-аминокислоты, β-нафтилаланин, α,α-диалкиламиноокислоты [75]. На основе АМП LL-37 человека получена панель из синтетических пептидов [76]. Показано, что пептид SAAP-148 подавляет

A. baumannii с МЛУ, не вызывая резистентности, а также предотвращает образование биопленки. Показано, что 4-часовой курс лечения мазью с гипромеллозой, содержащей SAAP-148, полностью ликвидирует острые и связанные с биопленкой инфекции *A. baumannii* в моделях раневой инфекции кожи человека *ex vivo* и кожи мыши *in vivo*. Синтетический пептид K11 (гибрид цекропина A1, мелиттина и магайнина 2) в субингибирующей концентрации проявляет антимикробную активность в отношении *A. baumannii* [77]. Кроме того, K11 обладает способностью модулировать уровни окислителей и антиоксидантов, способствуя тем самым регенерации раневой ткани у мышей. Показано, что K11, смешанный с гидрогелем карбапола, вызывает заживление инфицированных ран благодаря синергизму антибактериальных свойств АМП с увлажняющими свойствами геля. Таким образом, АМП, благодаря их двойной биоактивности, способны не только уничтожать инфекцию, но и проявлять иммуномодулирующие свойства. В связи с этим АМП рассматриваются как перспективные терапевтические средства для лечения инфекций кожи и мягких тканей.

Одним из подходов к идентификации пептидов, обладающих антибактериальными свойствами, является метод фагового дисплея [78]. Этим методом были выбраны пептиды, нацеленные на *A. baumannii* [79]. Пептиды, действующие на клеточную мембрану *A. baumannii*, идентифицировали с помощью биопенинга (аффинной селекции) с использованием пептидной библиотеки на пяти устойчивых штаммах, культивируемых на среде, содержащей кровь человека. Для идентификации панели антибиопленочных пептидов в среду добавляли биопленку, образованную штаммами *A. baumannii*. Таким образом обнаружили ряд пептидов, специфичных для *A. baumannii*, среди которых два пептида выбрали с учетом сход-

ства их аминокислотного состава с другими известными АМП. Оба пептида обладали антибактериальной активностью в отношении *A. baumannii* (МПК 500 мкг/мл), а также значительной антибиопленочной активностью, причем комбинация двух пептидов более эффективно снижала образование биопленки *A. baumannii*, чем каждый отдельный пептид [79].

Однако новые АМП, несмотря на многочисленные успешные результаты их испытания *in vitro* и *in vivo*, еще не нашли клинического применения. Внедрению АМП в медицинскую практику препятствует их разрушение тканевыми протеазами или цитотоксичность.

СВЕТОВАЯ АНТИМИКРОБНАЯ ТЕРАПИЯ

Световая антимикробная терапия как сама, так и в сочетании с фотосенсибилизатором приводит к развитию фотоокислительного стресса, который вызывает гибель микробов. Исследования *in vitro* показали, что синий свет эффективен против как планктонной, так и биопленочной форм роста всех шести патогенов ESKAPE, в том числе *A. baumannii* [80]. Этот вывод подтвержден также данными *in vivo*. Показано, что использование слабопроникающего синего света с длиной волны 415 ± 10 нм может быть предпочтительным при раневых инфекциях и дезинфекции внутрибольничной среды. Бактериальные биопленки также были высоко восприимчивы к синему свету. В целом, фотодинамическая терапия считается перспективным подходом к лечению инфекций, вызванных патогенами ESKAPE, особенно при местном применении.

МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ НАНОЧАСТИЦЫ

Металлические наночастицы, в частности серебро и содержащие серебро соединения, в последнее время вызывают все больший интерес при бактериальных инфекциях. Наночастицы серебра (AgNP), синтезированные с использованием физических, химических или биологических методов, высвобождают катионы серебра, которые нарушают транспорт электронов и путей передачи сигнала или вызывают образование активных форм кислорода, что, в конечном итоге, повреждает такие важные биомолекулы, как компоненты клеточной стенки, мембраны, ДНК или белки. Серебро является эффективным противомикробным средством с низкой токсичностью. Комбинация AgNP с антибиотиками может стать эффективным решением проблемы МЛУ штаммов *A. baumannii*, возможно, в более низких и менее токсичных дозах, чем те, которые в настоящее время обычно используются в клинических условиях. На мышках, зараженных резистентным к карбапенему *A. baumannii*, выявлена синергическая анти-

бактериальная активность AgNP в сочетании с полимиксином В с выживаемостью 60% по сравнению с контрольной группой, получавшей только антибиотик или только AgNP [81]. Так, помещения ожогового отделения, загрязненные *A. baumannii*, успешно дезинфицировали, используя автоматизированную аэрозольную систему сухого тумана пероксида водорода/катионов серебра [82].

ЛЕЧЕНИЕ ХЕЛАТОРАМИ ЖЕЛЕЗА

Железо – важный кофактор многих процессов в клетках бактерий, что позволяет рассматривать хелаторы железа и его конкурентов в качестве потенциальных антибактериальных агентов. Так называемая хелатная терапия направлена на метаболизм железа и достижение антибактериальной активности путем подавления поступления железа в клетки. У патогенных микроорганизмов существует эффективный механизм получения железа от хозяина с использованием сидерофоров – низкомолекулярных соединений, связывающих железо [83]. Комплекс сидерофор–железо связывается с соответствующими рецепторами на поверхности бактериальной клетки и усваивается там, где железо необходимо для внутриклеточного метаболизма. Большинство сидерофоров – это высокоаффинные хелаторы железа, сродство которых к Fe^{3+} настолько высоко, что они могут использовать организм хозяина как источник железа. Последние годы ведется разработка синтетических хелаторов для конкуренции с системами поглощения железа патогенных микроорганизмов. Показана высокая эффективность *in vitro* хелаторов Aр6619, дигидрохлорида VK28 и 2,2-дипиридила в отношении *A. baumannii* [84]. В качестве новых бактериостатических агентов предложены синтетические хелаторы железа на основе гидроксипиридиновых лигандов [83]. Получен ряд новых вторичных/третичных амин/амидных хелаторов, и на панели микроорганизмов оценены их антимикробные свойства. Таким образом, хотя установлено, что хелаторы железа могут секвестрировать железо и обеспечивать альтернативный подход к лечению без применения антибиотиков, необходимо их дополнительное изучение и характеристика эффективности *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антибиотики можно рассматривать как химическое оружие в межвидовой борьбе микроорганизмов, выработанное за миллионы лет эволюции. Более того, каждый раз, когда в клиническую практику вводили новый антибиотик, бактерии вырабатывали соответствующую сложную стратегию резистентности. Результатом этой непрекращающейся войны стало появление патогенов, вооруженных множествен-

ными механизмами резистентности, таких, как рассматриваемый в настоящем обзоре *A. baumannii*. Успеху выживаемости *A. baumannii* в качестве внутрибольничного патогена способствовала не только высокая степень приспособляемости за счет мутирования и возможности «переключать» свою геномную структуру путем горизонтального переноса генов резистентности, но также врожденная способность к образованию биопленок.

Распространение штаммов с множественной лекарственной устойчивостью требует разработки новых подходов к профилактике и лечению инфекций, вызванных *A. baumannii*, что, в свою очередь, подводит нас к необходимости поиска альтернативных путей лечения, которые в перспективе смогут широко применяться. На сегодняшний день в качестве таких методов предложены: бактериофаговая тера-

пия, профилактическая вакцинация, использование антимикробных пептидов, световая терапия, терапия ионами серебра и хелатная терапия. Тем не менее, для каждого из этих способов профилактики и лечения инфекций, вызванных *A. baumannii* с МЛУ, существуют ограничения, которые необходимо устранить, прежде чем эти способы лечения можно будет применять в клинической практике.

В нашем обзоре рассмотрены существующие направления исследований и перспективы расширения средств борьбы с особо опасными штаммами *A. baumannii*. ●

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ по научному проекту № 17-00-00393.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilbert D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J. // Clin. Infect. Dis. 2009. V. 48. № 1. P. 1–12.
- Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D.L., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J., Carmeli Y., et al. // Lancet Infect. 2018. V. 18. P. 318–327.
- Mulani M.S., Kamble E.E., Kumkar S.N., Tawre M.S., Pardesi K.R. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00539.
- Nemec A., Krizova L., Maixnerova M., van der Reijden T.J., Deschaght P., Passet V., Vanechoutte M., Brisse S., Dijkshoorn L. // Res. Microbiol. 2011. V. 162. P. 393–404.
- Gonzalez-Villoria A.M., Valverde-Garduno V. // J. Pathogens. 2016. V. 2016. Article ID 7318075. P. 1–10.
- Zapor M.J., Moran K.A. // Curr. Opin. Infect. Dis. 2005. V. 18. № 5. P. 395–399.
- Turton J.F., Kaufmann M.E., Gill M.J., Pike R., Scott P.T., Fishbain J., Craft D., Deye G., Riddell S., Lindler L.E., et al. // J. Clin. Microbiol. 2006. V. 44. № 7. P. 2630–2634.
- Howard A., O'Donoghue M., Feeney A., Sleator R.D. // Virulence. 2012. V. 3. P. 243–250.
- Aarabi B. // Neurosurgery. 1987. V. 20. P. 610–616.
- Joly-Guillou M.L., Bergogne-Berezin E., Vieu J.F. // Presse Medicale. 1990. V. 19. № 8. P. 357–361.
- Petrosillo N., Drapeau C.M., Di Bella S. Emerging Infectious Disease. Amsterdam: Elsevier. Acad. Press, 2014. Ch. 20. P. 255–272.
- Vincent J.L., Rello J., Marshall J., Silva E., Anzueto A., Martin C.D., Moreno R., Lipman J., Gomersall C., Sakr Y., et al. // J. Am. Med. Assoc. 2009. V. 302. P. 2323–2329.
- Beijerinck M.W. // Proc. Royal Acad. Sci. (Amsterdam). 1911. V. 13. P. 1066–1077.
- Brisou J., Prevot A. // Ann. l'Institut Pasteur. 1954. V. 86. № 6. P. 722–728.
- Baumann P., Doudoroff M., Stanier R.Y. // J. Bacteriol. 1968. V. 95. P. 1520–1541.
- Bergey D.H., Buchanan R.E., Gibbons N.E., American Society for Microbiology. // Bergey's manual determinative bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 1974. P. 1246.
- Paton R., Miles R.S., Hood J., Amyes S.G., Miles R.S., Amyes S.G. // Int. J. Antimicrob. Agents. 1993. V. 2. № 2. P. 81–87.
- Bouvet P.J., Grimont P.A. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1986. V. 36. № 2. P. 228–240.
- Hejnar P., Kolár M., Hájek V. // Acta Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Med. 1999. V. 142. P. 73–77.
- World Health Organization (WHO). Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy.htm/ru/
- Navon-Venezia S., Leavitt A., Carmeli Y. // J. Antimicrob. Chemother. 2007. V. 59. № 4. P. 772–774.
- Transatlantic Taskforce on Antimicrobial Resistance: Progress report. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/tatfar-progress_report_2014.pdf
- World Health Organization (WHO). Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254884/9789244509760-rus.pdf>
- World Health Organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1
- Wright M.S., Haft D.H., Harkins D.M., Perez F., Hujer K.M., Bajaksouzian S., Benard M.F., Jacobs M.R., Bonomo R.A., Adams M.D. // mBio. 2014. V. 5. № 1. P. e00963–13.
- Bjarnsholt T. // APMIS Suppl. 2013. V. 136. P. 1–51. doi: 10.1111/apm.12099.
- Batoni G., Maisetta G., Esin S. // Biophys. Acta Biomembr. 2016. V. 1858. P. 1044–1060.
- Lin Q., Deslouches B., Montelaro R.C., Di Y.P. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2018. V. 52. P. 667–672.
- Nasr P. // J. Hosp. Infect. 2020. V. 104. № 1. P. 4–11.
- Kotay S., Chai W., Guilford W., Barry K., Mathers A.J. // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 83. P. e03327–16.
- Garnacho-Montero J., Amaya-Villar R., Ferrandiz-Millon C., Diaz-Martin A., Lopez-Sanchez J.M., Gutierrez-Pizarra A. // Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 2015. V. 13. P. 769–777.
- Geisinger E., Isberg R.R. // PLoS Pathog. 2015. V. 11. P. e1004691.
- Tommasi R., Brown D.G., Walkup G.K., Manchester J.I., Miller A.A. // Nat. Rev. Drug Discovery. 2015. V. 14. P. 529–542.
- Fournier P.E., Vallenet D., Barbe V., Audic S., Ogata H.,

- Poirel L., Richet H., Robert C., Mangenot S., Abergel C., et al. // *PLoS Genet.* 2006. V. 2. № 1. P. e7.
35. Roca I., Espinal P., Vila-Farrés X., Vila J. // *Front. Microbiol.* 2012. V. 3. doi: 10.3389/fmicb.2012.00148.
36. Bonnin R.A., Poirel L., Nordmann P. // *Future Microbiol.* 2014. V. 9. P. 33–41.
37. Bernal P., Molina-Santiago C., Daddaoua A., Llamas M.A. // *Microb. Biotechnol.* 2013. V. 6. P. 445–449.
38. Whitehead N.A., Barnard A.M., Slater H., Simpson N.J., Salmond G.P. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2001. V. 25. № 4. P. 365–404.
39. Defraigne V., Verstraete L., van Bambeke F., Anantharajah A., Townsend E.M., Ramage G., Corbau R., Marchand A., Chaltin P., Fauvart M., et al. // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.02585.
40. Ефименко Т.А., Терехова Л.П., Ефременкова О.В. // *Антибиотики и химиотерапия.* 2019. № 5–6. С. 64–68.
41. Comeau A.M., Hatfull G.F., Krisch H.M., Lindell D., Mann N.H., Prangishvili D. // *Res. Microbiol.* 2008. V. 159. № 5. P. 306–313.
42. Pelfrene E., Willebrand E., Cavaleiro Sanches A., Sebris Z., Cavaleri M. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2016. V. 71. P. 2071–2074.
43. Ghajavand H., Esfahani B.N., Havaei A., Fazeli H., Jafari R., Moghim S. // *Res. Pharm. Sci.* 2017. V. 12. P. 373–380.
44. Федотова О.С., Захарова Ю.А. // *Медицинский альманах.* 2018. Т. 1. С. 126–129.
45. Hua Y., Luo T., Yang Y., Dong D., Wang R., Wang Y., Xu M., Guo X., Hu F., He P. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.02659.
46. Cha K., Oh H.K., Jang J.Y., Jo Y., Kim W.K., Ha G.U., Ko K.S., Myung H. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00696.
47. Zhou W., Feng Y., Zong Z. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00850.
48. Shivaswamy V.C., Kalasuramath S.B., Sadanand C.K., Basavaraju A.K., Ginnavaram V., Bille S., Ukken S.S., Pushparaj U.N. // *Microb. Drug Resist.* 2015. V. 21. P. 171–177.
49. Regeimbal J.M., Jacobs A.C., Corey B.W., Henry M.S., Thompson M.G., Pavlicek R.L., Quinones J., Hannah R.M., Ghebremedhin M., Crane N.J., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. P. 5806–5816.
50. Schooley R.T., Biswas B., Gill J.J., Hernandez-Morales A., Lancaster J., Lessor L., Barr J.J., Reed S.L., Rohwer F., Benler S., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017. V. 61. № 10. P. e00954–17.
51. Liu Y., Mi Z., Niu W., An X., Yuan X., Liu H., Wang Y., Feng Y., Huang Y., Zhang X., et al. // *Future Microbiol.* 2016. V. 11. P. 1383–1393.
52. Hatfull G.F. // *Bacteriophage Genomics. Curr. Opin. Microbiol.* 2008. V. 11. № 5. P. 447–453.
53. Lai M.J., Chang K.C., Huang S.W., Luo C.H., Chiou P.Y., Wu C.C., Lin N.T. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 4. e0153361. doi: 10.1371/journal.pone.0153361.
54. Lin H., Paff M.L., Molineux I.J., Bull J.J. // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.02257.
55. Pan Y.J., Lin T.L., Chen Y.Y., Lai P.H., Tsai Y.T., Hsu C.R., Hsieh P.F., Lin Y.T., Wang J.T. // *Microb. Biotechnol.* 2019. V. 12. № 3. P. 472–486.
56. Hernandez-Morales A.C., Lessor L.L., Wood T.L., Migl D., Mijalis E.M., Cahill J., Russell W.K., Young R.F., Gill J.J. // *J. Virol.* 2018. V. 92. № 6. e01064–17. doi: 10.1128/JVI.01064-17.
57. Liu Y., Leung S.S.Y., Guo Y., Zhao L., Jiang N., Mi L., Li P., Wang C., Qin Y., Mi Z., et al. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00545.
58. Zhang J., Xu L.L., Gan D., Zhang X. // *Clin. Lab.* 2018. V. 64. P. 1021–1030.
59. Lin N.T., Chiou P.Y., Chang K.C., Chen L.K., Lai M.J. // *Res. Microbiol.* 2010. V. 161. P. 308–314.
60. Lee I.M., Tu I.F., Yang F.L., Ko T.P., Liao J.H., Lin N.T., Wu C.Y., Ren C.T., Wang A.H.J., Chang C.M., et al. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. doi: 10.1038/srep42711.
61. Lee I.M., Yang F.L., Chen T.L., Liao K.S., Ren C.T., Lin N.T., Chang Y.P., Wu C.Y., Wu S.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. V. 140. P. 8639–8643.
62. Shahid F., Ashraf S.T., Ali A. // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 1946. P. 329–336.
63. McConnell M.J., Rumbo C., Bou G., Pachón J. // *Vaccine.* 2011. V. 29. P. 5705–5710.
64. Fattahian Y., Rasooli I., Mousavi Gargari S.L., Rahbar M.R., Darvish Alipour Astaneh S., Amani J. // *Microb. Pathog.* 2011. V. 51. P. 402–406.
65. Lei L., Yang F., Zou J., Jing H., Zhang J., Xu W., Zou Q., Zhang J., Wang X. // *Mol. Biol. Rep.* 2019. V. 46. P. 5397–5408.
66. Phoenix D.A., Dennison S.R., Harris F. // *Antimicrobial Peptides: Their History, Evolution, and Functional Promiscuity / Singapore: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.* 2013. P. 231.
67. Kang H., Kim C., Seo C.H., Park Y. // *J. Microbiol.* 2017. V. 55. P. 1–12.
68. Мусин Х.Г. // *Инфекция и иммунитет.* 2018. Т. 8. № 3. С. 295–308.
69. Жаркова М.С., Орлов Д.С., Кокряков В.Н., Шамова О.В. // *Вестник СПбГУ.* 2014. Сер. 3. Вып. 1. С. 98–114.
70. Pfalzgraff A., Brandenburg K., Weindl G. // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. doi: 10.3389/fphar.2018.00281.
71. Gaglione R., Dell’Olmo E., Bosso A., Chino M., Pane K., Ascione F., Itri F., Caserta S., Amoresano A., Lombardi A., et al. // *Biochem. Pharmacol.* 2017. V. 130. P. 34–50.
72. Ma Y.X., Wang C.Y., Li Y.Y., Li J., Wan Q.Q., Chen J.H., Tay F.R., Niu L.N. // *Adv. Sci. (Weinh).* 2019. V. 7. № 1. P. 1901872.
73. Du H., Puri S., McCall A., Norris H.L., Russo T., Edgerton M. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017. V. 7. doi: 10.3389/fcimb.2017.00041.
74. de la Fuente-Nunez C., Reffuveille F., Haney E.F., Straus S.K., Hancock R.E. // *PLoS Pathog.* 2014. V. 10. № 5. P. e1004152.
75. Chen H.L., Su P.Y., Kuo S.C., Lauderdale T.L.Y., Shih C. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01440.
76. de Breijl A., Riool M., Cordfunke R.A., Malanovic N., de Boer L., Koning R.I., Ravensbergen E., Franken M., van der Heijde T., Boekema B.K., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2018. V. 10. № 423. P. eaan4044.
77. Rishi P., Vashist T., Sharma A., Kaur A., Kaur A., Kaur N., Kaur I. P., Tewari R. // *Pathog. Dis.* 2018. V. 76. doi: 10.1093/femspd/fty072.
78. Huang J.X., Bishop-Hurley S.L., Cooper M.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. V. 56. P. 4569–4582.
79. Irani N., Basardeh E., Samiee F., Fateh A., Shooraj F., Rahimi A., Shahcheraghi F., Vaziri F., Masoumi M., Pazhouhandeh M., et al. // *Microb. Pathog.* 2018. V. 121. P. 310–317.
80. Halstead F.D., Thwaite J.E., Burt R., Laws T.R., Raguse M., Moeller R., Webber M.A., Oppenheim B.A. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. V. 82. P. 4006–4016.
81. Wan G., Ruan L., Yin Y., Yang T., Ge M., Cheng X. // *Int. J. Nanomed.* 2016. V. 11. P. 3789–3800.
82. Cobrado L., Pinto S.A., Pina-Vaz C., Rodrigues A. // *Surg. Infect (Larchmt).* 2018. V. 19. P. 541–543.
83. Workman D.G., Hunter M., Wang S., Brandel J., Hubscher V., Dover L.G., Tétard D. // *Bioorganic Chem.* 2020. V. 95. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.103465.
84. Thompson M.G., Corey B.W., Si Yuan., Craft D.W., Zurawski D.V. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. V. 56. P. 5419–5421.

УДК 581.2

Инфекционные болезни растений: этиология, современное состояние, проблемы и перспективы защиты растений

П. А. Назаров^{1,2,3*}, Д. Н. Балеев⁴, М. И. Иванова⁵, Л. М. Соколова⁵, М. В. Каракозова⁶

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

²Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Московская обл., 141700 Россия

³Федеральный научный центр овощеводства, пос. ВНИИССОК, Московская обл., 143080 Россия

⁴ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, 117216 Россия

⁵Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства», д. Верее, Московская обл., 140153 Россия

⁶Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологии, Москва, 121205 Россия

*E-mail: nazarovpa@gmail.com

Поступила в редакцию 25.05.2020

Принята к печати 30.06.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11026

РЕФЕРАТ За последние годы отмечено увеличение числа заболеваний, вызванных фитопатогенными бактериями, грибами и вирусами. Эти возбудители поражают растения на разных стадиях их роста и производства сельскохозяйственной продукции. В зависимости от погодных условий и фитосанитарного состояния посевов распространенность болезней может достигать 70–80% от всей популяции растений, а урожайность снижаться в ряде случаев на 80–98%. Растения обладают врожденным клеточным иммунитетом, однако специфичные фитопатогены способны его преодолевать. В представленном обзоре рассмотрены фитопатогены вирусной, грибной и бактериальной природы, а также современные концепции защиты растений, методы химического, биологического, агротехнического контроля и идентификации фитопатогенов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бактерии, грибы, вирусы, пестициды, фитопатоген, селекция, устойчивость к болезням, интегрированная защита растений, биологический контроль, агротехнический контроль, иммунитет растений.

ВВЕДЕНИЕ

Считается, что растение подвержено заболеванию, если под действием факторов внешней среды в нем изменяются физиологические процессы, приводящие к нарушению нормальной структуры, роста, функций или других параметров. Болезни растений подразделяются на инфекционные и неинфекционные в зависимости от природы агента, вызывающего болезнь. Симптомы болезни могут зависеть от причины, вызвавшей заболевание, от характера и локализации воздействия, которое оказывается на растение. Факторы, вызывающие болезни растений, могут иметь биотическую и абиотическую природу. Неинфекционные заболевания обусловлены неблагоприятными условиями выращивания, они не передаются от больного растения здоровому, тогда как инфекционные заболевания могут распространяться от одного восприимчивого хозяина к другому, по-

скольку инфекционный агент способен размножаться внутри растения или на его поверхности.

Выделяют такие признаки болезней растений, как увядание, пятнистости (некрозы), налеты, пустулы, гнили, опухоли (наросты), деформации, мумификации, изменение окраски и разрушение пораженной ткани. Увядание обусловлено потерей тургора клеток и тканей, оно вызывается как абиотическими, так и биотическими факторами. Пятнистости в большинстве случаев появляются при отмирании части тканей растения под действием биотических факторов. Налеты и пустулы возникают при поражении растений грибами. Гнили приводят к отмиранию как внутриклеточного содержимого (бактериальные мокрые или грибные твердые гнили), так и к разрушению межклеточного вещества и оболочки клеток (грибные, сухие гнили). Опухоли возникают в результате разрастания пораженной ткани под влиянием

возбудителей болезни. Деформации (морщинистости, скрученности, курчавости, нитевидности листьев, уродливость плодов, махровость цветков) могут вызываться различными биотическими и абиотическими факторами вследствие оттока продуктов фотосинтеза, неравномерного поступления в растение питательных веществ и неравномерности роста различных элементов ткани. При мумификации наблюдается поражение органа растения мицелием гриба, что приводит к его усыханию, потемнению и уплотнению. Изменение окраски обычно обусловлено нарушением функций хлоропластов и низким содержанием хлорофилла в листьях, что проявляется светлой окраской участков листа (мозаики) или всего листа целиком (хлороз) [1, 2].

Возбудители инфекционных болезней могут распространяться по воздуху, с водой, переноситься животными и человеком и сохранять инфекционность долгие месяцы и годы. Естественными резервуарами инфекций являются почва, вода и животные, особенно насекомые.

Инфекционные заболевания растений вызываются в основном патогенными организмами, такими, как грибы, бактерии, вирусы, простейшие, а также насекомыми или паразитическими растениями [1]. С развитием сельского хозяйства инфекционные болезни растений становятся все более значимым фактором, влияющим на урожайность и экономическую эффективность. В полевых условиях каждое растение, культивируемое в виде монокультуры, имеет одинаковые стандартные условия и требования к посадке, уходу и уборке, что приводит к большей урожайности и меньшим затратам на производство, чем при использовании поликультуры [3]. За последние полвека современные технологии, в том числе и монокультуривание, сократили количество дополнительной земли, необходимой для производства продуктов питания. Однако ежегодное выращивание одной и той же культуры на одном и том же месте истощает почву и делает ее неспособной поддерживать здоровый рост растений. Другая критически важная проблема – подверженность монокультуры инфекционным заболеваниям. Даже на стадии хранения, транспортировки и распределения до конечного потребителя потери могут составлять до 30% (рис. 1) [4, 5]. Поэтому контролировать и предотвращать развитие инфекционных болезней необходимо на всех стадиях производства растениеводческой продукции: от технологий работы с семенами до доставки и хранения продукта на полках магазинов и в домах потребителей. В данном обзоре обобщена текущая информация о причинах и патогенетических механизмах инфекционных заболеваний растений, вызванных вирусами, бактериями и грибами, которые

поражают основные сельскохозяйственные культуры, включая зерновые, овощные и технические. Рассмотрено современное состояние, проблемы и перспективы защиты растений.

ИММУНИТЕТ РАСТЕНИЙ И МЕХАНИЗМЫ ЕГО ПРЕОДОЛЕНИЯ

Обычно растения обладают устойчивостью к неспецифичным для них патогенам, поскольку имеют восковую кутикулу, покрывающую эпидермальный слой клеток, и постоянно синтезируют различные антимикробные соединения, в то время как специфичные патогены используют разнообразные стратегии для проникновения в растения, что часто делает такую защиту неэффективной. Грибы могут проникать непосредственно в клетки эпидермиса или распространять гифы поверх растительных клеток, а также между ними, что не требует специальных структур или каких-либо особых условий, тогда как бактериям или вирусам часто необходимы либо поврежденные ткани, либо попадание в специализированные структуры (например, устьица), либо нужен специфический переносчик (вектор), которым обычно бывают насекомые, грибы и простейшие. Как же происходит инфицирование растений фитопатогенами? Чтобы представить это, необходимо обратить внимание, что растения, в отличие от животных, полагаются на врожденный иммунитет каждой клетки и системные сигналы, исходящие из мест заражения, а не на подвижные защитные клетки и соматическую адаптивную иммунную систему. При этом инфицирование патогенными микроорганизмами не всегда успешно из-за структурных изменений в клеточной стенке или запрограммированной гибели клеток.

У растений имеются так называемые трихомы – выросты эпидермиса, препятствующие росту и проникновению патогена. Трихомы могут содержать антимикробные соединения или обладать ингибирующим действием на микробные гидролитические ферменты, вовлеченные в повреждение клеточной стенки. Роль клеточной стенки невозможно переоценить, она является первым препятствием, которое должны преодолеть патогенные микроорганизмы, а успешная защита на данном рубеже обороны наиболее эффективна против неспецифических патогенов. Клеточная стенка состоит из микрофибрилл целлюлозы и гемицеллюлозы, она армирована лигнином, а также содержит значительное количество белков, выполняющих структурную и ферментативную функции [6]. Гетерогенность строения клеточной стенки растений вынуждает патогены применять разные стратегии для ее преодоления.

Антимикробные соединения растений – низкомолекулярные вещества небелковой природы – под-

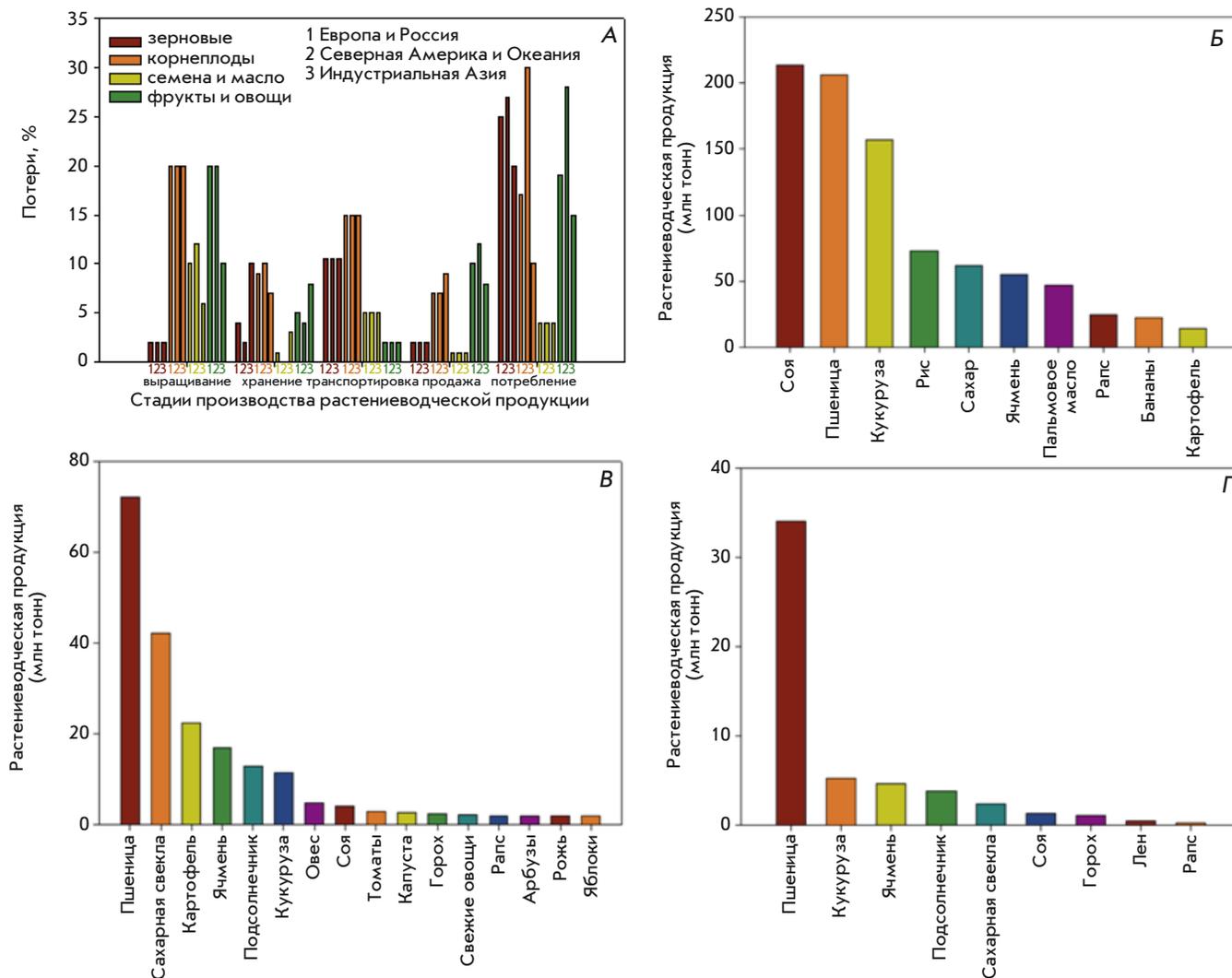


Рис. 1. А – потери растениеводства в индустриально развитых странах (средний и высокий доход на душу населения) на каждой стадии процесса производства – от выращивания до потребления в домохозяйствах. Представлены данные для трех регионов: 1 – Европа (включая Россию), 2 – Северная Америка и Океания (США, Канада, Австралия и Новая Зеландия) и 3 – индустриальная Азия (Япония, Китай, Южная Корея). Потери рассчитываются по массе в процентах к общей массе продукта на стадии производства [4]. Б – топ 10 наиболее выращиваемых растительных культур в мире (по импорту). В – наиболее выращиваемые растительные культуры в России. Г – основные экспортируемые растительные продукты в России [5]

разделяются на две группы: фитоантисипины и фитоалексины. Фитоантисипины, такие, как сапонины, фенилпропаноиды, алкалоиды, цианогенные гликозиды и гликозинолаты, представляют собой предсинтезированные растениями антимикробные соединения, тогда как фитоалексины образуются в ответ на атаку патогена. К фитоалексинам принадлежат разнообразные фенилпропаноиды, алкалоиды, терпены. Взаимная перекрываемость данных групп антимикробных агентов объясняется тем, что фитоалексины одних растений могут быть фитоантисипинами у других [7]. Кроме того, у растений малые РНК регулируют экспрессию широкого спектра генов и составляют естественный иммунитет против

вирусов [8]. Растения способны также поглощать и процессировать экзогенные шпилечные двухцепочечные РНК, чтобы подавлять экспрессию генов жизнеобеспечения и вирулентности патогенных вирусов растений, грибов или насекомых [9]. Можно отметить и важную роль в защите растений аспартат-специфичных апоптотических протеаз (фитаспаз), индуцирующих апоптоз, процесс программируемой клеточной смерти [10].

У растений имеются два типа иммунной системы. Одна использует трансмембранные поверхностные паттернраспознающие рецепторы, которые реагируют на медленно развивающиеся микробные или патогенассоциированные молекулярные структуры, а вто-

рая действует в основном внутри клетки, используя полиморфные белковые продукты, кодируемые большинством генов устойчивости к болезням (R) [11].

Гены R растений взаимодействуют с продуктами генов *avr* (avirulence) соответствующих им патогенов. При наличии соответствующего гена R, кодирующего рецептор, запускающий каскад защитного ответа, продукт гена *avr* распознается им, и растение проявляет фенотип устойчивости. Для защиты от бактериальной, вирусной, грибной инфекции и даже от насекомых растения кодируют только восемь классов продуктов генов R [12], которые запускают соответствующий каскад реакций, что говорит о вырожденности растительного иммунного ответа. При этом самих генов R в геноме может насчитываться примерно 100, что явно недостаточно для распознавания всех возможных патогенов. Поэтому распознавание патогенов растительным иммунитетом тоже, по-видимому, носит вырожденный характер [13].

Общий механизм защиты от патогенов можно, по-видимому, представить следующим образом: на первой фазе инфекции рецепторы распознают патогенассоциированные молекулярные структуры (например, флагеллин) и запускают иммунный ответ, который препятствует колонизации, что приводит к элиминации неспецифичной инфекции. Специфичный патоген вырабатывает эффекторную молекулу, которая интерферирует с молекулами иммунного ответа, и у чувствительных растений возникает так называемая опосредованная эффектором восприимчивость. У устойчивых растений эффекторы распознаются продуктами генов R с формированием опосредованной эффектором устойчивости, которая может запустить реакцию сверхчувствительности (программируемой гибели клеток) в области, пораженной патогеном [13]. У патогенов в ходе эволюции возникло несколько стратегий, направленных на подавление ответных мер защиты растений, таких, как изменение пути программируемой смерти клеток, ингибирование защитных веществ в клеточной стенке, изменение гормонального статуса растений и экспрессии защитных генов [14], однако продукты генов R защиты от вирусной инфекции могут запускать сразу несколько ответов. Так, например, для защиты от вируса X картофеля сначала запускается процесс ингибирования его репликации без реакции сверхчувствительности, а в случае сверхэкспрессии гена *avr* индуцируется и сама реакция сверхчувствительности, что делает растение чрезвычайно устойчивым к данному вирусу [15].

У растений может возникать так называемая приобретенная устойчивость, когда инфицирование, вызвавшее устойчивость в одном месте растения, распространяется на другие части растения. Это говорит

о том, что сигнальные молекулы могут направляться от пораженного участка к другим клеткам и вызывать повышение иммунитета к встреченному ранее патогену. Следует отметить, что приобретенная устойчивость – это не устойчивость, приобретенная *de novo*, а активация существующих генов устойчивости в ответ на встречу с патогеном. При этом в клетках происходит накопление салициловой кислоты и разных белков, связанных с патогенезом (например, хитиназы). Такая приобретенная устойчивость носит временный характер и может быть как системной, так и локальной [16].

Симбиотические бактерии, колонизирующие ризосферу, противодействуют почвенным возбудителям посредством различных механизмов: сидерофоры подавляют растительные патогены за счет конкуренции за железо; антибиотики подавляют конкурирующие микроорганизмы, а хитиназы и глюканазы лизируют микробные клетки. Кроме того, в результате симбиоза с бактериями у растений может наблюдаться еще один крайне интересный вид устойчивости – индуцированная системная устойчивость, которая опосредуется также салициловой кислотой, этиленом, жасмоновой кислотой, липополисахаридами. При этом индуцированная системная устойчивость в отличие от приобретенной системной устойчивости обеспечивает неспецифическую защиту, не имеет дозозависимой корреляции с эффектом, не воздействует непосредственно на патоген и не зависит от белков, связанных с патогенезом, однако зависит от генотипа растения и может вызывать изменения метаболизма растений, приводящие к общему увеличению устойчивости [16].

Таким образом, понимание механизмов собственной защиты растений и путей, используемых фитопатогенами для ее преодоления, позволяет получить системный подход к защите растений.

НАИБОЛЕЕ ОПАСНЫЕ ФИТОПАТОГЕНЫ

Вирусы и вироиды

Вирусы – неклеточные инфекционные агенты, которые могут реплицироваться только внутри живых клеток. Вирусы поражают все типы организмов, от растений и животных до бактерий и архей [17]. Они могут встраиваться в геном хозяина и находиться в нем в виде неактивного провируса или активно реплицироваться, контролируя процессы биосинтеза в клетках хозяина. При этом возможное подавление транскрипции вирусных генов приводит к развитию латентной инфекции [18]. Растительные вирусы представлены в основном одно- и двухцепочечными РНК-вирусами, одноцепочечными и ретровирусными ДНК-содержащими вирусами [17]. Из-за огромного

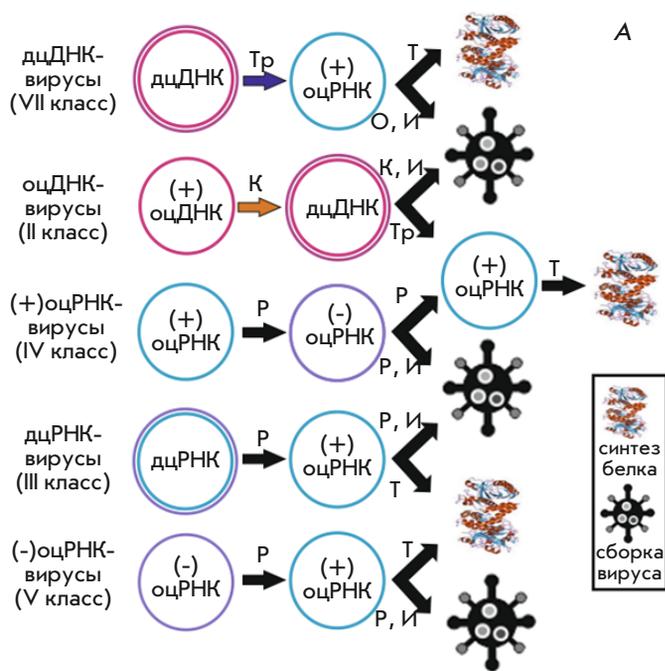
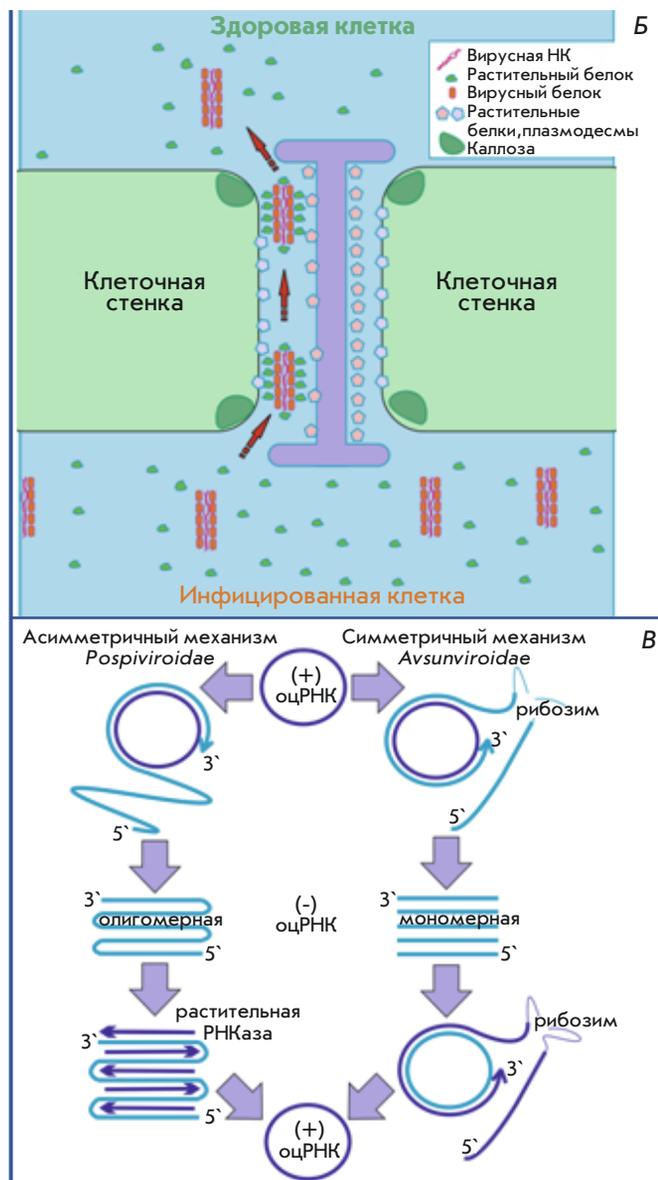


Рис. 2. А – вирусы (и вириоды) растений – стратегии репликации и трансляции. Тр – транскрипция, Р – репликация, К – репликация по типу катящегося кольца, Т – трансляция, О – обратная транскрипция, И – инкапсуляция, дц – двухцепочечная, оц – одноцепочечная, “-” – минус-цепь, “+” – плюс-цепь. **Б** – схема инфицирования вирусом (вириодом) соседних клеток через плазмодесмы. **В** – симметричный и асимметричный механизмы репликации вириодов

разнообразия генетического материала репродуктивные циклы и «образ жизни» разных вирусов часто очень существенно различаются (рис. 2А). Вирусы состоят из молекулы нуклеиновой кислоты и защитной белковой оболочки (капсид). Капсид иногда может содержать комбинацию белков и липидов, образуя липопротеиновую мембрану. Типичный размер растительного вируса – 30 нм [19].

Вирион пассивно проникает в цитоплазму растительной клетки через раны, вызванные механическим повреждением кутикулы и клеточной стенки, так как не способен самостоятельно пройти через эти структуры. При попадании в клетку вирус «распаковывается», при этом ДНК-содержащие вирусы должны проникнуть в ядро, чтобы начать транскрибироваться и синтезировать мРНК. Все вирусы должны кодировать по крайней мере два типа белков: репликационные белки, необходимые для синтеза нуклеиновой кислоты, и структурные белки, образующие капсид, и, в ряде случаев, белки, опосредующие подвижность вириона, которые обеспечивают транспорт вируса между клетками растений.



Собственные белки репликации вируса объединяются с клеточными белками, образуя комплекс, который производит несколько копий генома вируса, которые взаимодействуют со структурными белками с образованием новых вирионов, которые затем выходят наружу. Так завершается стандартный цикл развития вируса в клетке.

Вирусы растений могут передаваться вертикально (от родителей к потомству) и горизонтально (от больных растений к здоровым). Для проникновения в другую клетку вирусы используют небольшие межклеточные каналы, называемые плазмодесмами, и заражают таким образом соседние клетки (рис. 2Б). При этом зачастую вирусы экспрессируют белки, опосредующие подвижность вириона, которые модифицируют каналы для облегчения передачи инфекции в соседнюю клетку [20]. Так происходит

локальное заражение растения. Чтобы инфицировать все растение, вирусу необходимо проникнуть в сосудистую систему растений, где, двигаясь пассивно с током веществ по флоэме через ситовидные трубки, он может инфицировать клетки, удаленные от первичного участка заражения [19, 20].

Некоторые вирусы очень стабильны и термостойки, способны долгое время сохранять жизнеспособность в растительных клетках и полученных из них продуктах [21, 22], передаваться за счет пассивного механического переноса от растения к растению [23]. Однако большинство растительных вирусов активно передается от зараженных растений к здоровым с помощью другого организма, называемого переносчиком (или вектором). Переносчики подразделяются на механические, в организме которых возбудитель болезни не размножается, и биологические, в организме которых протекает часть жизненного цикла возбудителя инфекции [24]. Основными переносчиками вирусов растений являются питающиеся растениями членистоногие, нематоды и грибы [25].

Вирусы растений создают серьезную угрозу для широкого спектра сельскохозяйственных культур, и экономические потери, вызванные вирусами, занимают второе место после потерь, вызванных другими возбудителями [26]. При этом отдельные вирусы могут инфицировать более 1000 разных видов растений из более 85 семейств [27]. В большинстве субтропических и тропических районов вирусная инфекция может приводить к потере до 98% урожая [28]. На каждой стадии производства растениеводческой продукции вирусы проявляют себя по-разному: на стадии выращивания они могут причинять колоссальный ущерб, тогда как на стадии уборки, хранения и транспортировки ущерб от вирусной инфекции минимальный. Нельзя не отметить тот факт, что в ряде случаев некоторые растения могут быть заражены вирусами без каких-либо явных симптомов [29].

Симптомы вирусных болезней можно разделить на пять основных типов: угнетение роста (выражается в задержке роста всего растения или угнетении роста главных побегов); изменение окраски (мозаика, хлоротичные кольца, хлороз листьев, пестролепестность); деформации (морщинистость, гофрированность, нитевидность); некрозы, нарушение репродуктивной функции (стерильность цветов, бесплодность плодов, опадение цветков и завязей) [2].

Отдельными инфекционными агентами являются вириды – кольцевые РНК, вызывающие различные болезни растений и животных. Таксономически они относятся к вирусам (семейства *Pospiviroidae* и *Avsunviroidae*), но лишены белковой оболочки (капсида) и представляют собой ковалентно-связанные молекулы одноцепочечной РНК длиной 200–500

нуклеотидов, что в 50–80 раз меньше генома вируса. Вириды не кодируют белков и не могут реплицироваться самостоятельно. Считается, что вириды могут использовать ДНК-зависимую РНК-полимеразу, эндорибонуклеазу и обычно молчащую ДНК-лигазу 1 клетки-хозяина для своей репликации [30]. Репликация виридов происходит по механизму катящегося кольца, при этом вириды семейства *Pospiviroidae* реплицируются по асимметричному пути, тогда как вириды семейства *Avsunviroidae* – по симметричному пути (рис. 2В). Молекулярный механизм патогенного действия виридов не до конца изучен. Считается, что вириды могут вызывать изменение фосфорилирования продуктов генов за счет связывания с киназами клетки [31], а также влиять на уровень экспрессии генов, связанных с ростом, стрессом, развитием и защитой [32], индуцировать белки, связанные с патогенезом, в ходе инфекции [33], вызывать посттранскрипционное подавление экспрессии генов за счет РНК-интерференции, нарушение сплайсинга [34] и деметилирование генов рРНК. Удивительно, что замена одного нуклеотида в определенной позиции вызывает сильное изменение патогенности вирида [35]. У виридов семейства *Pospiviroidae* молекула РНК содержит пять доменов: центральный домен (С), в котором находится центральная консервативная область, играющая важную роль в репликации вирида; домен патогенности (Р), обуславливающий проявление симптомов заболевания; вариабельный домен (V), возможно, играющий роль в адаптации вирида, и транспортные домены T1 и T2 (при совместном заражении двумя виридами эти домены могут обмениваться, что может влиять на эволюцию виридов). Вириды семейства *Avsunviroidae* не имеют центральной консервативной области, но содержат последовательности, участвующие в создании рибозимных структур, необходимых для саморасщепления цепей РНК [36].

Основные симптомы виридных болезней – угнетение роста растения или его отдельных органов, изменение окраски (хлороз, антоцианоз), деформация различных органов [2].

Таким образом, вирусы и вириды представляют собой довольно большую группу патогенов, вызывающих болезни растений и способные нанести серьезный урон урожаю в случае отсутствия контроля и профилактических мероприятий, особенно при заражении на ранних стадиях развития растений.

Бактерии и фитоплазмы

Бактерии встречаются почти повсеместно и могут быть патогенами животных, растений и грибов [37]. Наследственная информация бактерий закодирована в ДНК, свернутой в хромосомы, и их может быть

больше, чем одна на клетку. Также бактериальная клетка может содержать мобильные внехромосомные генетические элементы – плазмиды, которые могут кодировать важные факторы вирулентности или, наоборот, факторы биологического контроля. Бактерия может содержать профаг – интегрированную в геном ДНК бактериофага. Бактерии обычно размножаются бинарным делением, при этом хромосомная ДНК удваивается обычно параллельно с удвоением внехромосомных элементов. Процесс клеточного деления требует наличия потенциала на мембране бактерий [38]. Бактерии могут содержать несколько плазмид, которые могут быть утеряны при делении. Так, например, *Pantoea stewartii* может содержать до 13 различных плазмид [39]. Хотя бактерии обычно передают плазмиды внутри своей популяции [40], горизонтальный перенос генетической информации остается довольно распространенным в мире прокариот.

Бактерии имеют клеточную мембрану, отделяющую цитоплазму от внешней среды. По структуре клеточной стенки бактерии подразделяются на грамположительные и грамотрицательные [41]. Клеточная стенка грамположительных бактерий состоит из мембраны и толстого слоя пептидогликана, основным компонентом которого является многослойный муреин, а дополнительными – белки, липиды, тейхоевые и тейхуроновые кислоты. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий состоит из двух мембран, между которыми находится пептидогликановый слой. Наружная мембрана содержит липополисахариды, а также порины. Отсутствуют тейхоевая и липотейхоевая кислоты.

В связи с наличием клеточной стенки бактерии вынуждены иметь системы секреции для откачки ксенобиотиков, секреции различных белков и факторов вирулентности (рис. 3А). Системы секреции делятся на несколько групп в соответствии со своей структурой. Известно не менее шести типов систем секреции, специфичных для грамотрицательных бактерий, четыре типа – для грамположительных бактерий, а два типа имеются у обеих групп бактерий [42]. Также системы секреции крайне необходимы для вирулентности фитопатогенных бактерий. Необходимо отметить, что при делении бактериальной клетки может наблюдаться асимметрия по типу материнской-дочерней клетки, где материнская клетка сохраняет большую часть транспортеров систем секреции, тогда как дочерняя клетка получает меньшую часть транспортеров и вынуждена их синтезировать *de novo* [43].

Обычно фитопатогенные бактерии растут медленней, чем непатогенные, выделенные из растений, и имеют температурный оптимум 20–30°C.

Бактериальные патогены содержат несколько типов генов, называемых генами вирулентности (рис. 3Б), которые необходимы для инфицирования или повышения вирулентности, и специфичные для заболевания гены, которые играют решающую роль в проявлении заболеваний. Некоторые гены важны для распознавания хозяина, прикрепления патогена к поверхности растения, образования инфекционных структур, проникновения и колонизации ткани хозяина. Факторы патогенности или связаны с бактериальной поверхностью, или выделяются в окружающую среду. Патогенные бактерии вызывают множество серьезных заболеваний растений во всем мире (меньше, чем грибы или вирусы), экономический ущерб от них также сравнительно меньше, чем от грибов и вирусов [44]. Бактерии наносят ущерб на всех стадиях производства растениеводческой продукции. Кроме того, из-за повышения среднегодовой температуры есть основания полагать, что ущерб от бактериозов, а также экономические затраты будут только возрастать в ближайшие годы, так как при увеличении среднесуточной температуры в летний период на 3–4°C распространенность бактериозов повышается в 2 раза, а пораженность растений – на 30–50% [45].

Выделяют два типа бактериозов: системные (возбудитель проникает в сосудистую систему растения, распространяется по проводящим пучкам и прилегающим к ним тканям, с нарушением нормального процесса поступления в растение воды) и локальные (поражение паренхимных тканей отдельных органов растений). Основные симптомы бактериальных болезней: увядание, некроз, хлороз, гниль, опухоли (галлы) и парша.

Фитоплазмы и спироплазмы – группы очень мелких (диаметром около 1 мкм) бактерий, которые не имеют клеточной стенки (от внешней среды они отделены цитоплазматической мембраной) и вызывают фитоплазмоз и остановку роста. Фитоплазмы, как и родственные им микоплазмы, по всей видимости, – одни из наиболее низкоорганизованных, самостоятельно воспроизводящихся живых организмов [46]. Геном фитоплазм составляет 0.5–1.3 млн п.н. [47], тогда как геном *Mycoplasma genitalium*, модельного организма для изучения минимального генома, состоит из 0.58 млн п.н. [48]. Фитоплазмы могут перемещаться с помощью скольжения [49], тогда как представители рода *Spiroplasma* имеют спиральную форму и движутся путем скручивания [50]. Культивирование фитоплазм в бесклеточных средах затруднено, что указывает на их большую зависимость от метаболизма хозяев [51].

Фитоплазмоз существенно снижает как объем получаемой продукции, так и его качество. Потери урожая достигают 40% (баклажан), 60% (томат),

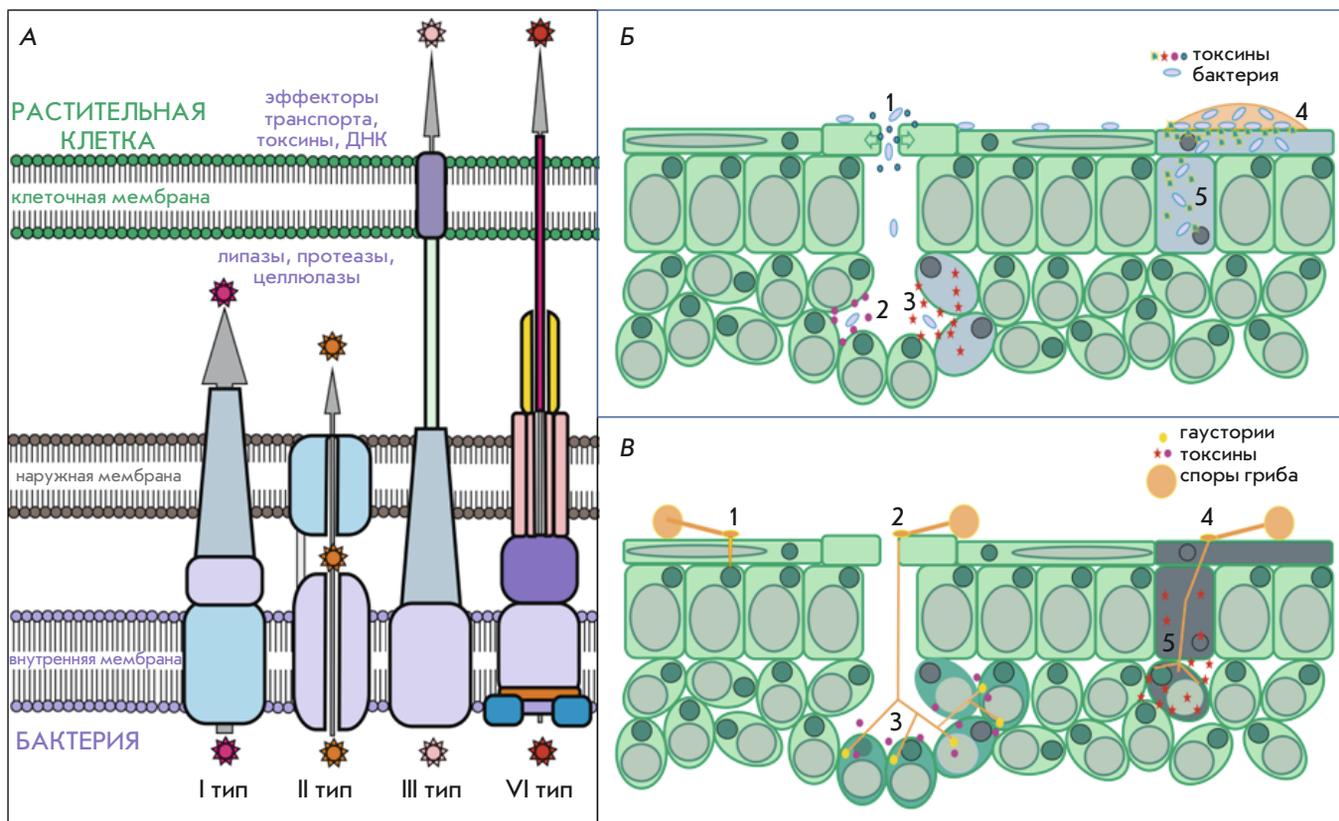


Рис. 3. А – системы секреции бактерий, используемые для инфекции растительных клеток и тканей. Б – пути развития бактериальной инфекции: 1 – проникновение через устьица за счет фитотоксинов, 2 – секреция фитотоксинов для модификации физиологических и иммунных функций и метаболизма растений, 3 – секреция фитотоксинов для деградации клеточной стенки и цитотоксического воздействия на растительные клетки, 4 – колонизация поверхности растения и образование биопленок, 5 – повреждение клеток растений за счет образования кристаллов льда. В – пути развития грибной инфекции: 1 – проникновение в неповрежденную клетку в месте прикрепления апрессория за счет комбинации механической силы и ферментов, разрушающих клеточную стенку растений, 2 – проникновение гриба через устьице, 3 – секреция фитотоксинов для модификации физиологии, иммунного ответа и метаболизма растений у биотрофных грибов, 4 – проникновение гриба через рану, 5 – секреция фитотоксинов для деградации клеточной стенки и цитотоксического воздействия на растительные клетки

93% (перец), 30–80% (картофель), 100% (огурец) [52]. Для растений, пораженных фитоплазмозом, характерны такие нарушения развития генеративных органов, как виресценции (позеленение цветков и утрата их нормальной пигментации), филлодии (превращение части цветка в листовидное образование), пролиферации (появление нескольких «неправильных» цветков вместо одного). Кроме того, при фитоплазмозе могут развиваться «ведьмины метлы» (повышенная кустистость), карликовость и увядание растений, деформации листьев. Известен единственный случай, когда фитоплазмоз приводит к экономически полезному эффекту – фитоплазмоз пуансеттии, популярного сезонного декоративного растения.

Грибы

Грибы – типичные представители надцарства Eukaryota. В отличие от бактерий они имеют слож-

ностроенную клетку, имеющую обособленное ядро и митохондрии. Размер генома грибов значительно меньше, чем у большинства эукариот, но значительно больше, чем у прокариот. Грибы имеют клеточную стенку, которая обычно состоит из хитина, маннана и хитозана, в состав клеточной стенки входят также белки, липиды и полифосфаты. Грибы формируют мицелий – систему тонких, ветвящихся гиф, который может не иметь межклеточных перегородок и образует синцитий. Грибы представлены во всех экологических нишах и могут приносить значительный вред. Грибы эволюционно намного старше растений, таким образом, длительность их совместного сосуществования сравнима с эволюционным возрастом высших растений [53]. Около 80% растений, присутствующих сегодня на нашей планете, связаны симбиозом с грибами [54], однако грибы иногда нарушают тонкий баланс взаимовыгодного сотрудничества, превращаясь

в патогены растений, классифицируемые как биотрофы, гембиотрофы и некротрофы. Обычно патогенные грибы проникают в растения через повреждения листьев и устьица, однако во многих случаях важную роль играют секретлируемые ферменты грибов, разрушающие клеточную стенку растений, и специфические инфекционные структуры (рис. 3В). В случае некротрофов, имеющих широкий диапазон хозяев, клетки-хозяева быстро погибают под действием комбинации ферментов, разрушающих клеточную стенку растений, активных форм кислорода и/или токсинов [55, 56]. В случае биотрофов, чей жизненный цикл связан с живой хозяйской клеткой, грибы секретлируют эффекторные молекулы, подавляющие иммунную систему растений. Эти грибы проявляют специфичность и взаимодействуют с хозяином через специализированные биотрофные гифы в межфазной зоне, где поглощаются синтезированные растением биомолекулы [57]. Грибы могут образовывать специфические выросты гиф – апрессории, выполняющие функцию прикрепления гриба к субстрату, которые позволяют патогену проникать через клеточную стенку с помощью комбинации механической силы и ферментов, разрушающих клеточную стенку растений. Через разрушенные участки от основания апрессориев выходит гаустория, внедряющаяся в полость растительной клетки. Гаустории, как правило, содержат большое число митохондрий и рибосом, в них хорошо развит эндоплазматический ретикулум, а от растительной клетки гаустория обычно отделена инвагинацией плазмалеммы хозяина [58]. При этом можно предположить, что повышенное давление защиты растений может вызвать переход от биотрофии к некротрофии [53].

Фитопатогенные грибы – наиболее опасные возбудители болезней растений, наносящие вред на всех стадиях производства растениеводческой продукции. Наиболее востребованным способом борьбы с грибами считается обработка фунгицидами. Применение фунгицидов связано с серьезными экологическими и медицинскими рисками, а именно, с появлением резистентности и с горизонтальным переносом генов резистентности с образованием видов с множественной устойчивостью [59]. В качестве фунгицидов в мировом сельском хозяйстве используется не менее 150 химических соединений с различными механизмами действия, однако в настоящее время зафиксированы случаи возникновения резистентности у самых разных видов фитопатогенов против почти всех основных классов фунгицидов [60].

К основным симптомам грибных болезней относятся увядание, пятнистости, налет (мицелий и спороношение гриба на поверхности пораженных органов), пустулы (скопление спороношений грибов), опухоли,

деформации, мумификации (зараженная ткань ссыхается, темнеет, становится плотной) и гнили [2].

В настоящее время обнаружено более 10000 видов грибов, ассоциированных с растениями, и не удивительно, что грибные заболевания наносят больший вред, чем болезни, вызываемые другими патогенными микроорганизмами [61].

Комплексные заболевания

Хотя считается, что болезнь растений вызывает один вид или даже один штамм патогена, микробы в природе встречаются в основном как часть сложных мультивидовых консорциумов/сообществ. Большинство лабораторных исследований сосредоточено на отдельных штаммах, выращенных в чистой культуре, однако они не могут объяснить «сложное» течение некоторых заболеваний растений. Поэтому болезни, в патогенез которых вовлечено более одного патогена, обычно называют «сложными» из-за сложности их диагностики и последующего контроля [62]. Между вирусами, бактериями, грибами и разными группами патогенов могут возникать синергические взаимодействия. Например, синергизм по типу вирус–вирус наблюдается при совместном заражении вигны початковой вирусами мозаики вигны и мозаики огурца, при этом тяжесть заболевания и степень задержки роста больше, чем при заражении индивидуальными вирусами [63]. Синергизм по типу бактерия–бактерия, усиливающий тяжесть заболевания, наблюдается при совместном заражении томата бактериями *Pseudomonas corrugata* и *P. mediterranea*, вызывающими пробковый некроз томатов [64]. Синергизм по типу гриб–гриб встречается довольно часто, вызывая комплексные заболевания, например, комплекс аскохитоза гороха [65], комплекс порока развития манго [66] и др. Примером синергического взаимодействия разных групп патогенов может служить апикальный некроз грецкого ореха, вызванный взаимодействием многочисленных патогенных грибов и бактерии *Xanthomonas arboricola* [67]. Синергизм различных патогенов, приводящий к более тяжелым симптомам заболевания, встречается чаще, чем ожидалось, и может иметь решающее значение для понимания микробного патогенеза и эволюции, а также последующей разработки эффективных стратегий борьбы с болезнями [62].

Таким образом, фитопатогены встречаются повсеместно и вызывают различные болезни растений (рис. 4).

Идентификация фитопатогенов

Ранняя диагностика заболеваний растений – ключевой фактор, определяющий своевременное применение защитных мер и, как следствие, влияющий

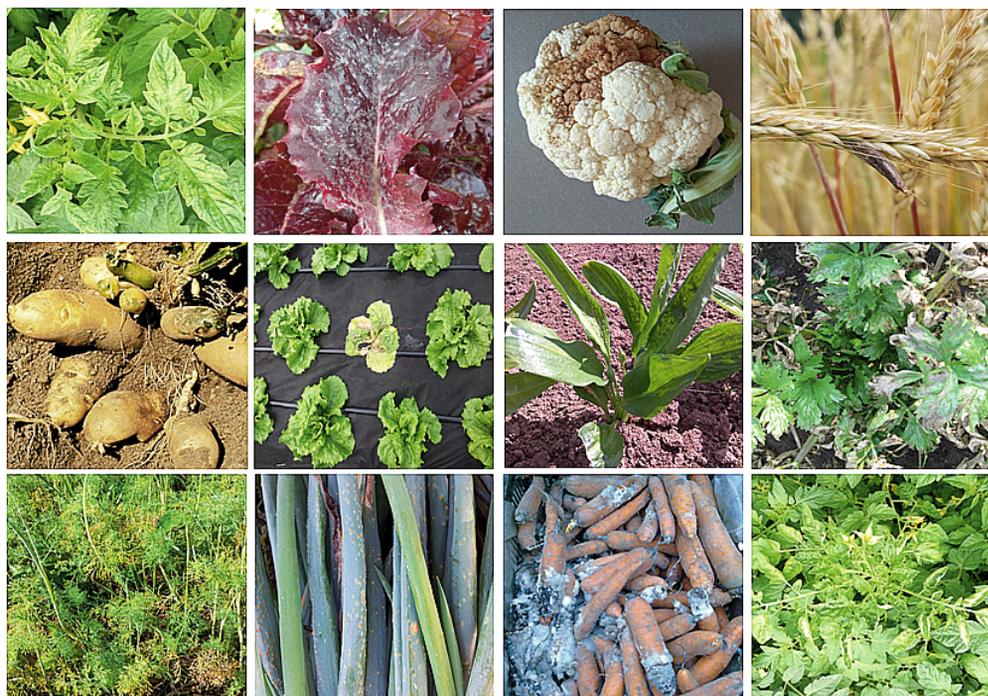


Рис. 4. Инфекционные болезни растений. Слева направо, верхний ряд: вирусная мозаика томата, ложная мучнистая роса на салате, бактериоз цветной капусты, спорынья на ржи. Средний ряд: вирус веретеновидности клубней картофеля (William M. Brown Jr., с изменениями), бактериоз салата, смешанная вирусная инфекция на медвежьей луке (вирус мозаики огурца, вирус табачной мозаики), септориоз сельдерея. Нижний ряд: фузариоз укропа, ржавчина лука, черная гниль (альтернариоз) моркови, вирус скручивания листьев томата

на урожайность и качество продуктов растениеводства. В настоящее время наряду с традиционной визуальной диагностикой и методом индикаторных растений для точного определения заболеваний растений необходимо использовать серологические методы и методы, основанные на ДНК- и РНК-технологиях. К основным распространенным методам серологической диагностики можно отнести иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг, дот-блот-гибридизацию, иммунохроматографию [68], серологически специфичную электронную микроскопию [69]. Методы, использующие ДНК, включают флуоресцентную гибридную реакцию *in situ* [70], различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР), а именно вложенную ПЦР, кооперативную ПЦР, мультиплексную ПЦР, ПЦР в реальном времени и ДНК-фингерпринтинг. Методы, в которых используется РНК, включают изотермическую амплификацию нуклеиновых кислот [71], систему диагностики в реальном времени AmpliDet RNA [72], ПЦР с обратной транскрипцией. Эти методы позволяют быстро и точно детектировать патоген и определять его таксономическую принадлежность. Однако разрабатываются новые методы еще более быстрой, точной и чувствительной детекции. К таким методам можно отнести секвенирование нового поколения и метагеномный анализ, двухгибридный анализ, фазовый дисплей, биосенсорные технологии на основе электрохимии и биофотоники [73]. Таким образом, используемые методы позволяют точно идентифицировать фитопатоген даже при отсутствии симптомов инфекции.

Интегрированная защита растений (ИЗР)

Система управления фитосанитарным состоянием экосистем за счет комплексного использования различных приемов защиты растений для обеспечения фитосанитарного благополучия территории эффективно применяется во многих странах [74].

ИЗР основана на оценке приемлемого уровня вредителей, для чего устанавливаются пороги вредоносности. Необходимым условием при этом является постоянный мониторинг вредителей, карантинные мероприятия и чистота семян, выбор устойчивых сортов, культивированных в данной области. Если уровень вредоносности достигнут, то преимущественно применяются методы механического и биологического контроля, однако, при необходимости ответственно и таргетировано применяют методы химического контроля.

Затраты на ИЗР и химические методы практически сопоставимы, но ИЗР обеспечивает более длительный эффект, способствует увеличению урожайности на 10–30%, повышает качество продукции, снижает климатические риски, имеет выраженное экологическое преимущество [75].

Семенной фонд

В соответствии с парадигмой ИЗР здоровый посадочный материал является необходимым условием эффективного применения этой системы. К сожалению, семена большинства растений часто служат резервуаром разнообразных фитопатогенов, при этом инфекция может находиться как на поверхности семени, так и внутри него. Сегодня существует несколько

стратегий контроля передачи патогена с семенами: использование свободных от патогенов семян и поиск способов предпосевной обработки семян. Наиболее эффективным способом борьбы с грибами считается обработка семян фунгицидами. При этом контактные фунгициды применяют для уничтожения патогена на поверхности семени, а трансламинарные могут проникать в семя и там уничтожать патоген. Эти препараты должны действовать особенно деликатно, чтобы не повредить зародыш [76]. В последние годы разработаны различные стратегии борьбы с возбудителями болезней на семенах, включая физическую обработку (механическая и термическая обработка, ультразвуковое воздействие, ультрафиолетовое излучение), обработку природными соединениями и агентами биологического контроля, а также обработку семян веществами, индуцирующими резистентность [77].

Ежегодно в России в целом высевается около 11 млн тонн семян сельскохозяйственных культур. Удельный вес отечественных семян в посевах зерновых культур составляет 90%, кукурузы – 46%, овощных культур – 43%, сои – 42%, ярового рапса – 32%, подсолнечника – 26% [78], а доля используемых в России зарубежных семян в зависимости от культуры варьирует от 30 до 90%, а их стоимость достигает 681 тыс. долларов США. Доля семенного бизнеса в общих продажах крупных агрохимических компаний, таких, как Syngenta, Bayer, DuPont, Dow, Monsanto, увеличивается, они приобрели семенные компании и всесторонне расширили свои исследования по защите растений, разрабатывая и создавая устойчивые сорта и гибриды с использованием современных высокоточных и высокопроизводительных технологий, включая геномное редактирование [79].

Селекция и биоинженерия растений

В современной селекции растений на устойчивость к патогенам используются подходы и методы классической и клеточной селекции. Появление полных геномных последовательностей некоторых экономически важных культур в настоящее время дает возможность эффективно проводить поиск генов устойчивости, а также соответствующих им ДНК-маркеров. В настоящее время активно используются маркеры на основе полиморфизма ДНК (RFLP, RAPD, AFLP, CAPS) и коротких tandemных повторов (SSR), технологии ДНК-микрочипов (DArT) [80, 81]. Используя пирамидирование генов, можно добиться долговременного увеличения устойчивости растений [82] за счет разработки генно-инженерных сортов и методов отдаленной гибридизации.

Современные методы биотехнологии приобретают все большее значение для создания устойчивых

к вирусам сортов и гибридов растений. Внедрение в модифицируемое растение антисмыслового гена позволяет нарушить процесс размножения вируса [83]. Используется также встраивание в геном растения гена белка, имеющего сродство к вирусной РНК и ингибирующего его репликацию [84], вызывающего задержку экспрессии транспортного белка или же модификацию плазмодесмы [85]. Постоянная экспрессия хитиназы или лизоцима бактериофага T4 приводит к повышению устойчивости растений к грибным и бактериальным инфекциям [86, 87]. Получены трансгенные растения картофеля, транскрибирующие РНК-рибозим, который расщепляет минус-цепь РНК вириона веретеновидности клубней картофеля [88].

Новые методы селекции на устойчивость к растительным патогенам включают мощные молекулярные инструменты для точной генетической модификации, в том числе систему CRISPR/Cas9, позволяющую более точно редактировать геном, чем с помощью *Agrobacterium*-опосредованной трансформации [89].

Агротехнический контроль

Агротехнический контроль – обязательный компонент системы ИЗР. Адекватная агротехника повышает устойчивость растений к болезням и предупреждает массовое развитие инфекции путем создания оптимальных условий для роста и развития растений. При этом основное значение имеют севооборот и подбор предшественников, система обработки почвы, удобрения, сроки посева и уборки, уничтожение сорняков и послеуборочных растительных остатков [90]. Существенное значение имеют размещение соседних культур в севообороте и обработка почвы [91]. Необходимо уничтожать послеуборочные остатки и сорную растительность, на которых сохраняется большое количество возбудителей, а многие сорняки служат резервуарами некоторых патогенов.

Химический контроль

Химический контроль имеет решающее значение для предотвращения потерь, связанных с болезнями растений, особенно при появлении многочисленных фунгицидов специфического действия, что расширяет возможности их направленного применения.

Общие затраты на исследование, разработку и регистрацию нового средства защиты растений выросли с 152 млн долларов США в 1995 до 286 млн долларов США в 2014 году. Мировые продажи с 1999 года ежегодно увеличивались примерно на 6.5% [92]. На рынке представлены более 600 различных средств химического контроля (фунгициды, пестициды, гербициды, нематоциды, моллюскоциды, родентициды и антибиотики), сегодня эта отрасль оценивается более чем в 50 млрд долларов США [93].

В настоящее время существуют строгие правила использования химических пестицидов, и многие продукты сняты с продаж либо запрещены, либо не прошли перерегистрацию. Так, например, в настоящее время в США запрещены в качестве бытовых и сельскохозяйственных пестицидов 6 из 10 основных продуктов химического контроля, применяемых в 1968 году.

Биологический контроль и альтернатива антибиотикам

Современное сельское хозяйство с каждым годом становится все более высокотехнологичным и мультидисциплинарным [94]. Бесконтрольное применение гербицидов приводит к появлению популяций сорняков, устойчивых к гербицидам [95]. Хотя борьба с заболеваниями зависит главным образом от устойчивости сельскохозяйственных культур и агротехники, однако такие антибиотики, как гентамицин, оксолиновая кислота, окситетрациклин и стрептомицин, используются в растениеводстве [96]. Использование антибиотиков в растениеводстве составляет около 0.12%, однако в последние годы в связи с повсеместным развитием антибиотикорезистентности все больший акцент переносится на альтернативные формы борьбы с фитопатогенами. Одна из таких форм борьбы – применение разнообразных мето-

дов биоконтроля [97]. В качестве примеров биологического контроля можно привести использование штаммов-антагонистов и продуцентов антибиотиков, применение бактериофагов, насекомых для борьбы с сорняками, насекомых-паразитов для борьбы с насекомыми-вредителями. Для контроля заболеваний растений используются вещества, которые не являются в прямом смысле антибиотиками или антимикотиками, такие, как фотосенсибилизаторы, бактериофаги, фаголизины, антимикробные пептиды, антибиопленочные соединения [98], особенно если помимо антибактериальной активности они обладают другими полезными свойствами, например, снижают уровень активных форм кислорода или ингибируют бактериальные помпы множественной лекарственной устойчивости [99].

Наиболее значимые растительные патогены

Несколько лет назад журнал *Molecular Plant Pathology* провел опросы среди специалистов в области молекулярной патологии растений, на основании которых были выбраны 10 наиболее значимых фитопатогенных грибов [100], вирусов [101] и бактерий [102] (таблица).

С подобным выбором нельзя не согласиться, однако структура продуктов сельского хозяйства и культур, выращиваемых в России, отличается от обще-

Наиболее значимые фитопатогены

Вирусы	Бактерии	Грибы
Общемировые		
<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i>
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Puccinia</i> spp.
<i>Cucumber mosaic virus</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>Potato virus Y</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Cauliflower mosaic virus</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	<i>Blumeria graminis</i>
<i>African cassava mosaic virus</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Mycosphaerella graminicola</i>
<i>Plum pox virus</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Colletotrichum</i> spp.
<i>Brome mosaic virus</i>	<i>Dickeya dadantii</i>	<i>Ustilago maydis</i>
<i>Potato virus X</i>	<i>Dickeya solani</i>	<i>Melampsora lini</i>
<i>Citrus tristeza virus</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Phakopsora pachyrhizi</i>
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Potato leafroll virus</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	
<i>Tomato bushy stunt virus</i>		
Существенные для России		
<i>Barley stripe mosaic virus</i>	<i>Candidatus Phytoplasma</i> spp.	<i>Alternaria solani</i>
<i>Wheat streak mosaic virus</i>	<i>Xanthomonas translucens</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>
<i>Winter wheat Russian mosaic virus</i>	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Plasmopara halstedii</i>
<i>Oat Siberian mosaic virus</i>	<i>Rathayibacter tritici</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	<i>Tilletia caries</i>
<i>Lettuce mosaic virus</i>	<i>Acidovorax citrulli</i>	

мировых с преобладающим вкладом пшеницы, сахарной свеклы, картофеля, ячменя, овса, подсолнечника и кукурузы, что вносит коррективы в перечень патогенов, специфичных для этих культур [2, 65, 79, 103, 104].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С развитием современных методов диагностики, геномного редактирования и геномного секвенирования, микробиомного и протеомного анализа исследование механизмов воздействия фитопатогенов на растения перешли в мультидисциплинарную плоскость. В настоящем обзоре мы попытались привести

целостную картину современного состояния защиты растений, хотя, к нашему глубокому сожалению, многие аспекты взаимодействия растений и фитопатогенов, такие, как, например, повреждения под действием белков-нуклеаторов, которые вызывают образование кристаллов льда в клетках растений [105], или консервативность последовательностей эффекторных молекул бактерий – патогенов человека, животных и растений [106], мы не рассматривали. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-116-50156.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Horst R.K. Plant / In: Westcott's Plant Disease Handbook. Boston, MA: Springer, 2001. P. 65–530.
- Шкалик В.А., Белошапкина О.О., Букреев Д.Д., Горбачев И.В., Джалилов Ф.С.-У., Корсаков И.В., Минаев В.Ю., Стройков Ю.М. Защита растений от болезней. М.: Колос, 2010. 404 с.
- Cardinale B.J., Matulich K.L., Hooper D.U., Byrnes J.E., Duffy E., Gamfeldt L., Balvanera P., O'Connor M.I., Gonzalez A. // Am. J. Botany. 2011. V. 98. № 3. P. 572–592.
- FAO. Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention. Rome, 2011.
- FAOSTAT (http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country).
- Смирнова О.Г., Кочетов А.В. // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2015. Т. 19. № 6. С. 715–723.
- Чесноков Ю.В. // Сельскохозяйственная биология. 2007. № 1. С. 16–35.
- Khalid A., Zhang Q., Yasir M., Li F. // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 43.
- Морозов С.Ю., Соловьев А.Г., Калинина Н.О., Тальянский М.Е. // Acta Naturae. 2019. Т. 11. № 4. С. 13–21.
- Чичкова Н.В., Галиуллина Р.А., Белошистов Р.Е., Балакирева А.В., Вартапетян А.Б. // Биоорг. химия. 2014. Т. 40. С. 658–664.
- Dangl J.L., Jones J.D. // Nature. 2001. V. 411. № 6839. P. 826–833.
- Gururani M.A., Venkatesh J., Upadhyaya C.P., Nookaraju A., Pandey S.K., Park S.W. // Physiol. Mol. Plant P. 2012. V. 78. P. 51–65.
- Jones J.D., Dangl J.L. // Nature. 2006. V. 444. № 7117. P. 323–329.
- Abramovitch R.B., Martin G.B. // Curr. Opin. Plant Biol. 2004. V. 7. № 4. P. 356–364.
- Maule A.J., Caranta C., Boulton M.I. // Mol. Plant Pathol. 2007. V. 8. № 2. P. 223–231.
- van Loon L.C., Bakker P.A., Pieterse C.M. // Annu. Rev. Phytopathol. 1998. V. 36. P. 453–483.
- Koonin E.V., Senkevich T.G., Dolja V.V. // Biol. Direct. 2006. V. 1. P. 29. doi: 10.1186/1745-6150-1-29.
- Richert-Pöggeler K.R., Minarovits J. // Plant virus-host interaction: Molecular approaches and viral evolution / Eds Gaur R.K., Hohn T., Pradeep Sharma P. Elsevier Inc., 2014. P. 263–275.
- Gergerich R.C., Dolja V.V. // Plant Health Instructor. 2006. doi: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01
- Dorokhov Y.L., Ershova N.M., Sheshukova E.V., Komarova T.V. // Plants (Basel). 2019. V. 8. № 12. P. 595.
- Sriwahyuni W., Hanapi M., Hartana I. // Hayati J. Biosci. 2008. V. 15. № 3. P. 118–122.
- Iftikhar Y., Jackson R., Neuman B.W. // Pak. J. Agri. Sci. 2015. V. 52. № 3. P. 667–670.
- Hull R. Plant Virology. Cambridge, MA: Acad. Press, 2014. 1118 p.
- Gray S.M., Banerjee N. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999. V. 63. № 1. P. 128–148.
- Walkey D. Applied Plant Virology. London: Chapman and Hall, 1991.
- Pennazio S., Roggero P., Conti M. // Arch. Phytopathol. Plant Protect. 1996. V. 30. № 4. P. 283–296.
- Zitter T.A., Murphy J.F. // Plant Hlth Instructor. 2009. <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/pdlesons/Pages/Cucumbermosaic.aspx>
- Czosnek H., Laterrot H. // Arch. Virol. 1997. V. 142. P. 1391–1406.
- Takahashi H., Fukuhara T., Kitazawa H., Kormelink R. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 2764.
- Nohales M.-Á., Flores R., Daròs J.-A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. № 34. P. 13805–13810.
- Hiddinga H., Crum C., Hu J., Roth D. // Science. 1988. V. 241. № 4864. P. 451–453.
- Owens R.A., Tech K.B., Shao J.Y., Sano T., Baker C.J. // Mol. Plant-Microbe Interact. 2012. V. 25. № 4. P. 582–598.
- Owens R.A., Hammond R.W. // Viruses. 2009. V. 1. № 2. P. 298–316.
- Adkar-Purushothama C.R., Perreault J.P. // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2020. V. 11. № 2. e1570.
- Wassenegger M., Spieker R.L., Thalmeier S., Gast F.U., Riedel L., Sängler H.L. // Virology. 1996. V. 226. № 2. P. 191–197.
- Малиновский В.И. // Сельскохозяйственная биология. 2009. № 5. С. 17–24.
- Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. № 12. P. 6578–6583.
- Strahl H., Hamoen L.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 27. P. 12281–12286.
- Coplin D.L., Rowan R.G., Chisholm D.A., Whitmoyer R.E. // Appl. Environ. Microbiol. 1981. V. 42. № 4. P. 599–604.
- Dimitriu T., Marchant L., Buckling A., Raymond B. // Proc. Biol. Sci. 2019. V. 286. № 1905. 20191110.
- Gupta R.S. // Crit. Rev. Microbiol. 2000. V. 26. P. 111–131.
- Green E.R., Mecsas J. // Microbiol. Spectr. 2016. V. 4. № 1. 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015
- Bergmiller T., Andersson A.M.C., Tomasek K., Balleza E., Kiviet D.J., Hauschild R., Tkačik G., Guet C.C. // Science. 2017. V. 356. № 6335. P. 311–315.
- Vidhyasekaran P. Bacterial disease resistance in plants: Molecular biology and biotechnological applications. Binghamton, NY: Haworth Press, 2002. 464 p.

45. Игнатова А.Н., Егорова М.С., Ходыкина М.В. // Защита и карантин растений. 2015. № 5. С. 6–10.
46. Maniloff J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. № 19. P. 10004–10006.
47. Kakizawa S., Oshima K., Namba S. // Trends Microbiol. 2006. V. 14. № 6. P. 254–256.
48. Fraser C.M., Gocayne J.D., White O., Adams M.D., Clayton R.A., Fleischmann R.D., Bult C.J., Kerlavage A.R., Sutton G., Kelley J.M., et al. // Science. 1995. V. 270. № 5235. P. 397–403.
49. Uenoyama A., Miyata M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 36. P. 12754–12758. doi: 10.1073/pnas.0506114102.
50. Shaevitz J.W., Lee J.Y., Fletcher D.A. // Cell. 2005. V. 122. № 6. P. 941–945.
51. Kube M., Schneider B., Kuhl H., Dandekar T., Heitmann K., Migdoll A.M., Reinhardt R., Seemüller E. // BMC Genomics. 2008. V. 9. P. 306. doi: 10.3389/fmicb.2019.01349
52. Kumari S., Nagendran K., Rai A.B., Singh B., Rao G.P., Bertaccini A. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 1349. doi: 10.3389/fmicb.2019.01349
53. Zeilinger S., Gupta V.K., Dahms T.E., Silva R.N., Singh H.B., Upadhyay R.S., Gomes E.V., Tsui C.K., Nayak S.C. // FEMS Microbiol. Rev. 2016. V. 40. № 2. P. 182–207.
54. Karandashov V., Nagy R., Wegmüller S., Amrhein N., Bucher M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 16. P. 6285–6290.
55. Wang X., Jiang N., Liu J., Liu W., Wang G.L. // Virulence. 2014. V. 5. № 7. P. 722–732.
56. Heller J., Tudzynski P. // Annu. Rev. Phytopathol. 2011. V. 49. P. 369–390.
57. Yi M., Valent B. // Annu. Rev. Phytopathol. 2013. V. 51. P. 587–611.
58. Horbach R., Navarro-Quesada A.R., Knogge W., Deising H.B. // J. Plant Physiol. 2011. V. 168. № 1. P. 51–62.
59. Soanes D., Richards T.A. // Annu. Rev. Phytopathol. 2014. V. 52. P. 583–614.
60. Шербакова Л.А. // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. № 5. С. 875–891.
61. Hussain F., Usman F. Abiotic and Biotic Stress in Plants. London, UK: IntechOpen, 2019.
62. Lamichhane J.R., Venturi V. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 385.
63. Pio-Ribeiro G., Wyatt S.D., Kuhn C.W. // Phytopathology. 1978. V. 68. P. 1260–1265.
64. Moura M.L., Jacques L.A., Brito L.M., Mourao I.M., Duclos J. // Acta Hort. 2005. V. 695. P. 365–372.
65. Le May C., Potage G., Andrivon D., Tivoli B., Outreman Y. // J. Phytopathol. 2009. V. 157. P. 715–721.
66. Freeman S., Shtienberg D., Maymon M., Levin A.G., Ploetz R.C. // Plant Dis. 2014. V. 98. P. 1456–1466.
67. Belisario A., Maccaroni M., Coramusi A., Corazza L., Pryor B.M., Figuli P. // Plant Dis. 2004. V. 88. P. 426.
68. Martinelli F., Scalenghe R., Davino S., Panno S., Scuderi G., Ruisi P., Villa P., Stroppiana D., Boschetti M., Goulart L.R., et al. // Agron. Sustain. Dev. 2015. V. 35. № 1. P. 1–25.
69. Derrick K.S. // Virology. 1973. V. 56. № 2. P. 652–653.
70. Salgado-Salazar C., Bauchan G.R., Wallace E.C., Crouch J.A. // Plant Methods. 2018. V. 14. P. 92. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0362-z>
71. Scuderi G., Golmohammadi M., Cubero J., López M.M., Cirvilleri G., Llop P. // Plant Pathology. 2010. V. 59. P. 764–772.
72. Szemes M., Schoen C.D. // Anal. Biochem. 2003. V. 315. № 2. P. 189–201.
73. Goulart L.R., Vieira C.U., Freschi A.P., Capparelli F.E., Fujimura P.T., Almeida J.F., Ferreira L.F., Goulart I.M.B., Brito-Madurro A.G., Madurro J.M. // Crit. Rev. Immunol. 2010. V. 30. P. 201–222.
74. Maredia K.M., Dakouo D., Mota-Sanchez D. Integrated Pest Management in the Global Arena. Wallingford, UK: CABI Publ., 2003. 560 p.
75. Любовецкая А. // Защита растений. 2017. № 9. С. 2–3.
76. Lamichhane J.R., You M.P., Laudinot V., Barbetti M.J., Aubertot J.-N. // Plant Disease. 2020. V. 104. № 3. P. 610–623.
77. Spadaro D., Herforth-Rahmé J. van der Wolf J. // Acta Hort. 2017. V. 1164. P. 23–32.
78. Пивоваров В.Ф., Пышная О.Н., Гуркина Л.К., Науменко Т.С., Солдатенко А.В. // Овощи России. 2017. Т. 3. № 36. С. 3–15.
79. Nishimoto R. // J. Pestic. Sci. 2019. V. 44. № 3. P. 141–147.
80. Mohanta T.K., Bashir T., Hashem A., Abd Allah E.F., Bae H. // Genes (Basel). 2017. V. 8. № 12. P. 399.
81. Raats D., Yaniv E., Distelfeld A., Ben-David R., Shanir J., Bocharova V., Schulman A., Fahima T. // Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) markers in plant biology / Ed. Shavrukov Y. N.Y.: NOVA Publ., 2014.
82. Афанасенко О.С., Новожилов К.В. // Экологическая генетика. 2009. Т. 7. № 2. С. 38–43.
83. Simon-Mateo C., Garcia J.A. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1809. P. 722–731.
84. Чекалин Н.М. Генетические основы селекции зернобобовых культур на устойчивость к патогенам. Полтава: Интерграфіка, 2003. 186 с.
85. Hipper C., Brault V., Ziegler-Graff V., Revers F. // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. P. 154.
86. Richa K., Tiwari I.M., Devanna B.N., Botella J.R., Sharma V., Sharma T.R. // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 596.
87. Düring K., Porsch P., Fladung M., Lörz H. // Plant J. 1993. V. 3. P. 587–598.
88. Yang X., Yie Y., Zhu F., Liu Y., Kang L., Wang X., Tien P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. № 10. P. 4861–4865.
89. Borrelli V.M.G., Brambilla V., Rogowsky P., Marocco A., Lanubile A. // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1245. doi:10.3389/fpls.2018.01245.
90. Leoni C., de Vries M., ter Braak C.J.F., van Bruggen A.H.C., Rossing W.A.H. // Eur. J. Plant Pathol. 2013. V. 137. P. 545–561.
91. Panth M., Hassler S.C., Baysal-Gurel F. // Agriculture. 2020. V. 10. P. 16.
92. Hirooka T., Ishii H. // J. Gen. Plant Pathol. 2013. V. 79. P. 390–401.
93. Phillips McDougall. Evolution of the crop protection industry since 1960. Phillips McDougall, Midlothian, UK, 2018.
94. Schut M., Rodenburg J., Klerkx L., van Ast A., Bastiaans L. // Crop Protection. 2014. V. 56. P. 98–100.
95. Moss S.R. // Pesticide Outlook. 2003. V. 14. P. 164–167.
96. Stockwell V.O., Duffu B. // Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2012. V. 31. № 1. P. 199–210.
97. Köhl J., Kolnaar R., Ravensberg W.J. // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 845.
98. Назаров П.А. // Вестник РГМУ. 2018. № 1. С. 5–15.
99. Nazarov P.A., Osterman I.A., Tokarchuk A.V., Karakozova M.V., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Skulachev M.V., Kotova E.A., Skulachev V.P., Antonenko Y.N. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 1394.
100. Dean R., van Kan J.A., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., et al. // Mol. Plant Pathol. 2012. V. 13. № 4. P. 414–430.
101. Scholthof K.B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., et al. // Mol. Plant Pathol. 2011. V. 12. № 9. P. 938–954.
102. Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S.V., Machado M.A., et al. // Mol. Plant Pathol. 2012. V. 13. № 6. P. 614–629.
103. Алексеева К.Л., Иванова М.И. Болезни зеленных овощных культур (диагностика, профилактика, защита). М.: ФГБНУ «Росинформарготех», 2015. 188 с.
104. Alekseeva K.L., Baleev D.N., Bukharov A.F., Bukharova A.R., Ivanova M.I. // Картофель и овощи. 2015. № 12. С. 33–34.
105. Gurian-Sherman D., Lindow S.E. // FASEB J. 1993. V. 7. № 14. P. 1338–1343.
106. Ghosh P. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. V. 68. № 4. P. 771–795.

УДК 577.2, 577.29

Перспективные молекулярные мишени для фармакологической коррекции нейродегенеративных патологий

М. Е. Неганова, Ю. Р. Александрова, В. О. Небогатиков, С. Г. Клочков, А. А. Устюгов*

Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Московская обл., 142432 Россия

*E-mail: alexey@ipac.ac.ru

Поступила в редакцию 25.03.2020

Принята к печати 20.04.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10925

РЕФЕРАТ Создание лекарственных средств, эффективных при нейродегенеративных заболеваниях, сопряжено со множеством проблем, возникающих, в частности, при попытках воздействовать лишь на одну из причин патогенеза нейропатологий. С каждым годом все большие обороты набирает мультитаргетная терапия, основной принцип которой заключается в использовании препаратов, одновременно воздействующих на разные патологические звенья процесса нейродегенерации. Применение такой терапевтической стратегии предполагает не просто воздействие на симптомы, но и предотвращение развития патологических процессов, приводящих к нейродегенеративным заболеваниям и снижению когнитивных способностей. Наиболее общими и значимыми процессами в развитии нейродегенеративных заболеваний являются нейровоспаление и окислительный стресс, нарушение функционирования митохондрий, дисрегуляция экспрессии гистондеацетилаз и агрегация патогенных форм белка. В данном обзоре мы попытались сконцентрироваться на молекулярных механизмах перечисленных процессов и выделить основные мишени в каждом из них: активные формы кислорода, компоненты эндогенной системы антиоксидантной защиты клетки, триггеры нейровоспаления, металлопротеазы, гистондеацетилазы, α -синуклеин, тау-белки, нейромеланин, пресенилины и др. Рассмотренные процессы и молекулярные мишени могут служить отправной точкой при отборе соединений-лидеров, нацеленных на предотвращение или замедление развития нейродегенеративных заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА нейродегенерация, нейровоспаление, окислительный стресс, гистондеацетилазы, протеинопатия, агрегация патогенных белков.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АФК – активные формы кислорода; НДЗ – нейродегенеративные заболевания; А β – бета-амилоид (Amyloid beta); DAM – микроглия, связанная с болезнью (disease-associated microglia); НАТ – гистон-ацетилтрансфераза (histone acetyltransferase); HDACi – ингибиторы гистондеацетилаз (histone deacetylase inhibitors); HDAC – гистондеацетилазы (histone deacetylases); MMP-3, MMP-9 – матриксные металлопротеиназы 3, 9 (matrix metalloproteinase 3, 9); NMDA – N-метил-D-аспартат; mGluR5 – метаботропный глутаматный рецептор 5 (metabotropic glutamate receptor 5); PSEN1, PSEN2 – пресенилины 1, 2 (presenilin 1, 2); SIRT – сиртуины (sirtuins); TIM – транслоказа внутренней мембраны (translocase of the inner membrane); TOM – транслоказа внешней мембраны (translocase of the outer membrane); TREM2 – триггерный рецептор 2, экспрессируемый на миелоидных клетках (triggering receptor expressed on myeloid cells 2).

ВВЕДЕНИЕ

Разработка эффективных подходов к лечению нейропатологий – одна из наиболее востребованных задач современной биомедицины, учитывая отсутствие препаратов, влияющих на патогенез заболеваний. При этом количество больных с наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием (НДЗ) – болезнью Альцгеймера – и близкими формами деменции оценивается примерно в 30–35 млн и удваивается каждые 10 лет [1]. Ожидается, что через 10 лет это число достигнет 70 млн человек [2].

Общемировые затраты на лечение больных с нейропатологиями в 2015 г. составили 818 миллиардов долларов США и могут возрасти до 2 триллионов к 2030 г. [2]. Около 100 препаратов против болезни Альцгеймера ежегодно проходят клинические испытания, включая вакцины [3], однако с 2003 г., несмотря на огромные затраты, ни один новый препарат не вышел на рынок. Проведенный анализ современных тенденций в поиске и создании новых средств для терапии НДЗ дает основание заключить, что главные направления связаны с поиском мультитаргетных препаратов.

титаргетных соединений, действующих на ключевые звенья патогенеза [4]. В качестве таких звеньев рассматривают патологическую агрегацию специфических белков в мозге (протеинопатии), нейровоспалительные процессы, нарушение функционирования митохондрий и гистондеацетилаз (HDAC), которые действуют как регуляторные элементы при экспрессии генов, связанных с нейропатологиями.

ПРОБЛЕМЫ И МИШЕНИ ТЕРАПИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В настоящее время во всем мире около миллиарда человек страдают от нейродегенеративных заболеваний. Наиболее распространены болезни Альцгеймера, Паркинсона, боковой амиотрофический склероз. Эти заболевания могут возникнуть в результате сочетания геномных, эпигеномных, метаболических факторов и факторов окружающей среды. Риск развития большинства нейродегенеративных заболеваний увеличивается с возрастом. При этом развивается прогрессирующий нейродегенеративный процесс (в одних случаях гибель нервных клеток разных отделов головного мозга, в других – гибель мотонейронов), а также нейровоспалительные процессы.

Существующие на сегодняшний день методы не могут предотвратить или остановить прогрессирование нейродегенеративных заболеваний. Отсутствует и основная терапия, способная принести значительную пользу пациентам. Современные методы лечения могут лишь на некоторое время улучшить состояние больного, действуя на симптоматические проявле-

ния – нарушение когнитивных и моторных функций. Однако с повышением уровня жизни стремительно увеличивается и средний возраст людей, а вместе с ним и количество возрастзависимых заболеваний. В связи с этим первостепенное значение как в современной медицинской химии, так и в системе здравоохранения в целом имеют обнаружение новых мишеней лекарственных средств, усовершенствование методов синтеза и мишень-ориентированного отбора потенциальных нейропротекторов.

При нейродегенеративных заболеваниях прогрессирование патологии начинается за много лет до появления первых детектируемых симптомов. Многочисленные исследования в этой области привели к заключению, что среди патологических событий, наблюдаемых при этих расстройствах, существуют и схожие явления, которые могут объяснить, почему стареющий мозг настолько уязвим для нейродегенерации. При нейродегенеративных заболеваниях из-под системного контроля выходят такие физиологические процессы в нейронах, как эндосомально-лизосомальная аутофагия, нейровоспалительные реакции, митохондриальный гомеостаз, протеостаз. Изменения в окислительно-восстановительном балансе клетки, функционировании митохондрий, нарушения в экспрессии и активности работы эпигенетических ферментов и увеличение пула агрегированных белков с нарушенной третичной структурой (Aβ, α-синуклеина и т.д.) являются основными факторами развития нейродегенеративных заболеваний (рис. 1).

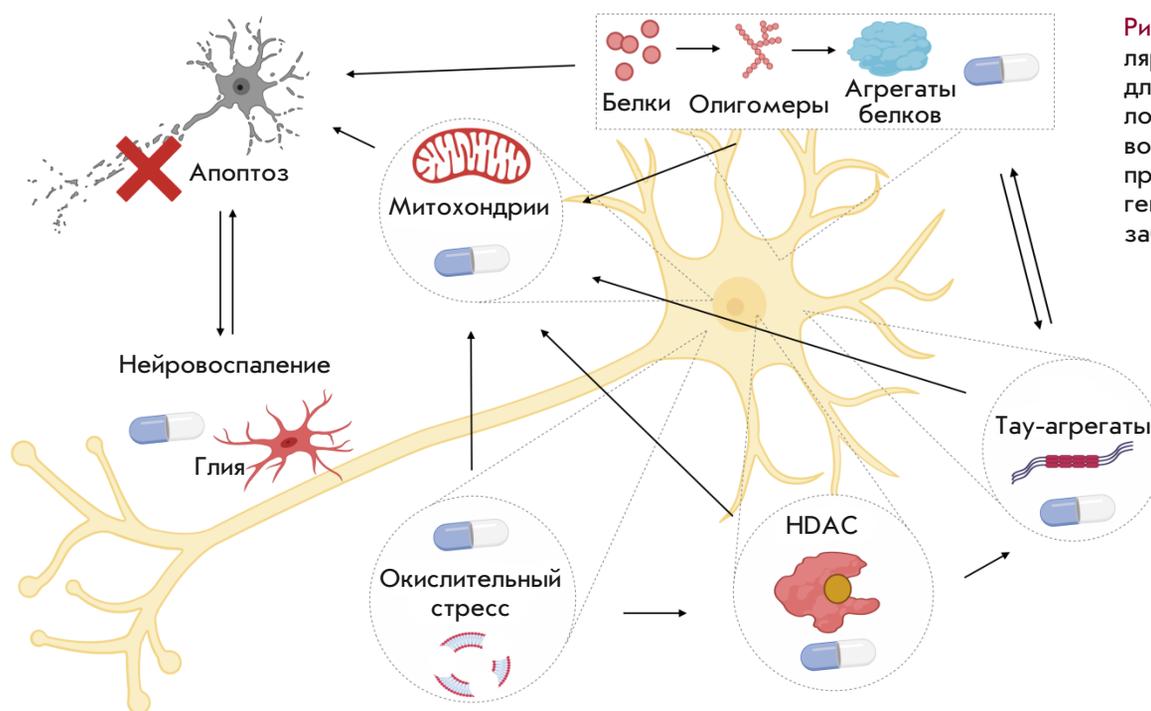


Рис. 1. Молекулярные мишени для фармакологического воздействия при нейродегенеративных заболеваниях

Окислительный стресс и, в частности, процесс перекисного окисления липидов, нарушение работы эндогенных антиоксидантных механизмов (в первую очередь, глутатионовой системы), дисфункция митохондрий (подавление активности комплекса I дыхательной цепи и комплекса IV – цитохром-с-оксидазы) взаимосвязаны и взаимно порождают друг друга, приводя к нейродегенеративным процессам [5–7]. Кроме того, остатки мертвых клеток и агрегированные белки, высвобождаемые во внеклеточную среду из нейрона, провоцируют глиальную активацию, высвобождение цитокинов и свободных радикалов, приводя к гибели нейронов, что создает еще один патологический процесс – нейровоспаление. Фармакологическое воздействие на вышеуказанные элементы ранних стадий развития нейродегенерации (рис. 1) может приостановить прогрессирование заболевания и имеет большое значение в терапии нейродегенерации.

Роль окислительного стресса в развитии нейродегенеративного процесса

Окислительному стрессу – нарушению прооксидантно-антиоксидантного баланса в пользу окислительных видов, который приводит к потенциальному повреждению клеток [8, 9] и обусловлен избыточным накоплением активных форм кислорода (АФК), а также сниженной активностью антиоксидантной системы защиты клеток, всегда отводилась решающая роль в развитии нейродегенеративных заболеваний (болезни Альцгеймера, Паркинсона и др.) и старения [10–13].

Как известно, в физиологических условиях уровень активных форм кислорода поддерживается на относительно низком уровне за счет работы эндогенных антиоксидантных механизмов, таких, как глутатионовая система, супероксиддисмутаза, каталаза и др. [14]. Однако с возрастом, под действием генетических и экологических факторов риска, окислительно-восстановительная система становится несбалансированной, в результате чего усиливается продукция активных форм кислорода [15, 16].

И хотя АФК в умеренных концентрациях играют важную роль в физиологических процессах (например, в регуляции сигнальных путей и индукции митогенного ответа), перепроизводство и нарушение баланса эффектов эндогенной антиоксидантной защиты приводят к окислительным повреждениям, таким, как посттрансляционные модификации, окисление белков, липидов и ДНК/РНК, что является общими чертами многих НДЗ [17, 18]. Так, у пациентов с различными нейропатологиями (в частности, болезнями Альцгеймера и Паркинсона) наблюдается сверхпродукция АФК в головном мозге

[19, 20], приводящая к интенсификации перекисного окисления липидов в биологических мембранах под действием свободных радикалов, увеличению содержания малонового диальдегида в системе, избыточному накоплению металлов переменной валентности, нарушению функционирования митохондрий и, как следствие, высвобождению из них апоптогенных факторов с последующим апоптозом нейронов (рис. 2) [21, 22].

Следует отметить, что такая уязвимость нервных клеток к окислительному повреждению обусловлена рядом причин [16, 23]. Так, мембранные липиды в мозге содержат большое количество полиненасыщенных жирных кислот, которые склонны к атаке свободными радикалами и перекисному окислению липидов. В дополнение к наличию таких легко окисляемых жирных кислот нервные клетки также имеют высокий уровень потребления кислорода, что и способствует в дальнейшем образованию АФК [24]. Кроме того, показано также, что мозг содержит достаточно небольшие количества ферментов собственной антиоксидантной защиты клеток, играющих важную роль в метаболизме свободных радикалов [25].

Малоновый диальдегид, 4-гидрокси-*транс*-2,3-ноненаль, акролеин, F2-изопростаны – известные маркеры окислительного стресса – регистрируются в мозге и спинномозговой жидкости пациентов с болезнью Альцгеймера. Так, Greilberger и соавт., исследуя кровь здоровых доноров и лиц с нейродегенеративными патологиями (с умеренными когнитивными нарушениями и с болезнью Альцгеймера), обнаружили значительное повышение уровней малонового диальдегида, карбонилированных белков и окисленного альбумина при НДЗ по сравнению с контрольной группой, что указывает на связь между процессом перекисного окисления липидов, индуцированным окислительным стрессом и развитием нейродегенеративных патологий [26]. 4-Гидрокси-*транс*-2,3-ноненаль обладает наиболее повышенной реакционной способностью, гиппокампулярной цитотоксичностью и способен накапливаться в значительных количествах в мозге и спинномозговой жидкости при болезнях Альцгеймера и Паркинсона [27, 28].

Окислительный стресс считается одной из основных причин обеих форм болезни Паркинсона: как наследственной, так и спорадической [17]. В биологическом материале пациентов с данной патологией выявлен высокий уровень окисленных липидов, белков и ДНК, а также сниженный уровень восстановленного глутатиона [29–31], что приводит к генерации более реакционноспособных видов АФК, образование которых опосредовано реакциями Фентона и Хабера–Вайса, способствующих окислительному

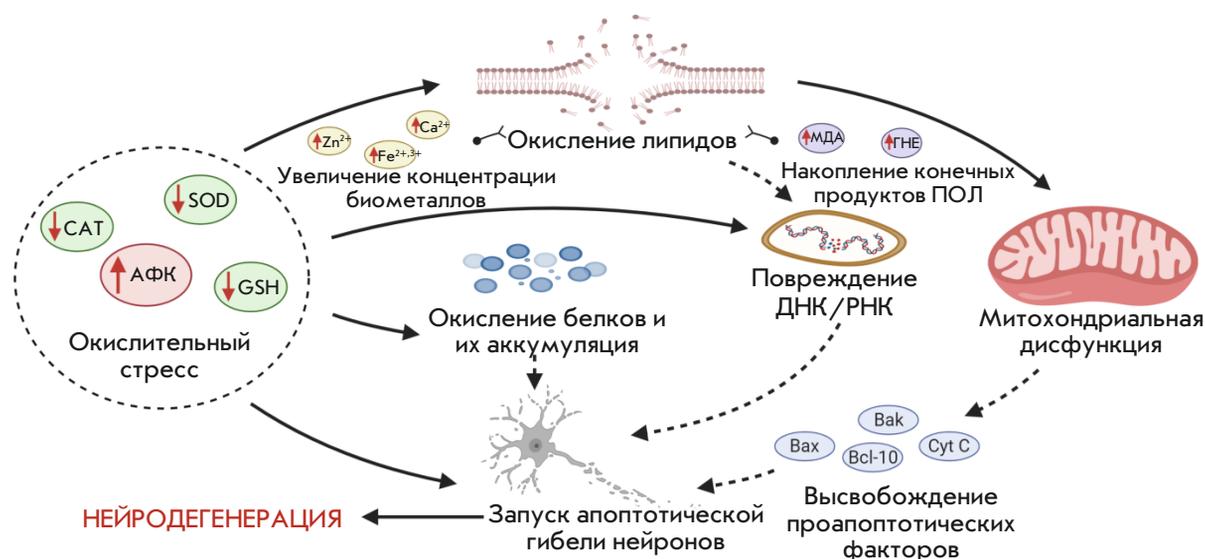


Рис. 2. Окислительный стресс в развитии нейродегенеративных заболеваний. Интенсификация окислительных процессов, связанных с гиперпродукцией активных форм кислорода и снижением активности эндогенной антиоксидантной системы защиты клеток, приводит к окислительному повреждению липидов, белков и ДНК/РНК, что, в свою очередь, запускает каскад апоптотической гибели нервных клеток и способствует развитию нейродегенерации

стрессу. Сверхпродукция активных форм кислорода приводит к дегенерации дофаминергических нейронов и, как следствие, к развитию ключевых симптомов болезни Паркинсона, в частности мышечной ригидности, брадикинезии, тремора покоя и постуральной неустойчивости. Так, при болезни Паркинсона регистрируется потеря 80–90% дофаминергических нейронов в черной субстанции головного мозга и 40–50% – в вентральной области покрышки среднего мозга [32].

Потенциал использования антиоксидантов при нейродегенеративных заболеваниях был подтвержден еще в конце прошлого века, при этом в настоящее время активно продолжается поиск новых нейропротекторов в ряду соединений, ингибирующих окислительные процессы. Так, прием витамина Е при болезни Альцгеймера (2000 МЕ в день в течение двух лет) замедляет снижение когнитивных функций [33], тогда как прием данного антиоксиданта в раннем возрасте потенциально снижает риск развития болезни Паркинсона [34]. Эффективным акцептором свободных радикалов в головном мозге является и витамин С, защищающий мембранные фосфолипиды от перекисного окисления и, что немаловажно, принимающий участие в биосинтезе катехоламинов [35]. Хотя аскорбиновая кислота и не является прямым поглотителем липофильных радикалов, но в сочетании с витамином Е она проявляет синергический эффект [36, 37]. Способностью захватывать активные формы кислорода, действуя

как хелатор металлов и модулятор ферментативной активности, обладает природный фитоалексин – ресвератрол [38, 39]. Его антиоксидантные свойства, такие, как эффективное ингибирование перекисного окисления липидов в гиппокампе головного мозга, подтверждены повышенной активностью каталазы [38]. Показано также, что экстракт листьев гинкго (*Ginkgo biloba* L.), обладающий мощнейшими антиокислительными свойствами, способен улучшать когнитивные функции головного мозга при болезни Альцгеймера путем снижения токсичности Аβ-бляшек [40].

Положительный эффект использования антиоксидантных соединений в качестве нейропротекторов подтвержден и результатами изучения производного природного соединения – аддукта алкалоида секуринина и триптамина – алломаргаритарина. Исследование нейропротекторных свойств данного конъюгата на различных моделях нейротоксичности с использованием первичной культуры нейронов коры головного мозга крысы показало, что алломаргаритарин обладает выраженной цитопротекторной активностью, что выразалось в увеличении числа выживших клеток после воздействия глутамата, Fe³⁺ и Аβ. Способность алломаргаритарина защищать нейроны от гибели коррелировала с его антиоксидантным потенциалом, а именно, наблюдалась концентрационная зависимость подавления процессов перекисного окисления липидов, вызванного ионами трехвалентного

железа и трет-бутилгидроксипероксидом [41, 42]. Алломаргаритарин обладает также противосудорожной активностью [43], что может быть обусловлено его антиоксидантным потенциалом, поскольку, как известно, окислительный стресс вовлечен в патогенез эпилепсии [44, 45]. Также антиоксидантные свойства рассматриваются в качестве одного из механизмов нейропротекторного действия и одного из биоизостерных аналогов коричной кислоты. Данное соединение умеренно ингибировало перекисное окисление гомогената мозга крыс и, что немало важно, прослеживалась тенденция к увеличению количества выживших клеток нейробластомы человека SH-SY5Y при моделировании иономицин-индуцированной нейротоксичности [46]. При оценке влияния структурных аналогов димебона, производных тетрагидро-гамма-карболинов, на соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона показано, что соединение DF-407, эффективно снижающее скорость накопления активных форм кислорода, также увеличивает соотношение GSH/GSSG, что свидетельствует о возможном влиянии DF-407 на работу эндогенной системы защиты клетки и коррелирует со снижением индуцированной глутаматом гибели нейронов коры головного мозга новорожденных крыс [47].

Таким образом, ключевая роль, которая отводится окислительному стрессу в развитии нейродегенеративных заболеваний, а также положительные результаты применения антиоксидантов в качестве потенциальных нейропротекторов позволяют предположить, что манипуляции уровнями активных форм кислорода можно рассматривать как перспективный вариант лечения нейропатологий и облегчения сопутствующих им симптомов.

Нейровоспалительные реакции при нейродегенеративном процессе

Нейровоспаление – патологический процесс, характерный для ряда нейродегенеративных заболеваний, таких, как болезни Паркинсона, Альцгеймера, боковой амиотрофической склероз и хорей Гентингтона. Многие из этих патологий относятся к протеинопатиям и характеризуются отложением специфических белков, в частности Аβ (при болезни Альцгеймера) [48], в результате чего происходит активация иммунокомпетентных клеток мозга и развиваются воспалительные реакции [49, 50]. При этом показано, что активированные клетки могут как способствовать уменьшению количества Аβ, так и приводить к усилению его токсического эффекта [48, 51, 52].

Основными резидентами иммунной системы в мозге являются клетки микроглии и астроциты, именно эти типы клеток принимают непосредственное уча-

стие в процессе воспаления. Так, нейропротекторные функции микроглии показаны на трансгенных мышцах, экспрессирующих ген *APP* человека под промотором *Thy-1* (линия APP23) [53]. Кроме того, важную роль во взаимодействиях клеток глии и нейронов играет пара рецепторов CX3CR1–CX3CL1. Хемокиновый рецептор CX3CR1 позволяет микроглии участвовать в формировании синапсов и снижать уровень Аβ [54, 55]. Экспрессия Toll-подобных рецепторов TLR-2 и TLR-4 клетками микроглии также способствует поглощению агрегированного Аβ [56]. S. Nickman и соавт., изучая на животных моделях роль хемокинового рецептора CX3CR1, рекрутирующего клетки глии, в патогенезе нейровоспаления отметили, что у гетерозиготных по гену этого рецептора мышей линии APP/PS1 (PS1-APP-CX3CR1^{+/-}) снижены концентрация агрегированного Аβ и количество сенильных бляшек в сером веществе мозга. Кроме того, уровни ферментов, лизирующих Аβ, у гетерозиготных животных были значительно выше, чем у мышей линии APP/PS1 [57].

Говоря о нейропротекторной роли астроцитов, стоит отметить, что высвобождаемые ими на ранней стадии провоспалительные цитокины TNF-α, TGF-β, IL-1β активируют близлежащие микроглиальные клетки, а также разлагают растворимую форму Аβ с помощью аполипопротеинов, в большей мере ApoE2. Поэтому считается, что астроциты могут выступать в качестве терапевтической мишени при болезни Альцгеймера [51].

Однако, поскольку при нейровоспалении в первую очередь нарушается баланс цитокинов и меняется микроокружение, часть глиальных клеток может выполнять провоспалительную функцию. Это обусловлено синтезом провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, TNF-α), токсическим действием самого Аβ и угнетением фагоцитарной функции микроглии при болезни Альцгеймера [58–60]. Показано также, что глия, окруженная агрегированным амилоидом, мигрирует в свободные от амилоида участки, при этом клетки не активируются и, как следствие, снижается их способность к деградации амилоида [61, 60].

Патологические эффекты астроцитов в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера обусловлены нарушением кальциевого обмена [62], усиленной секрецией глутамата [63], что приводит к эксайтотоксичности, а также секрецией токсичных изоформ аполипопротеина (ApoE3, ApoE4) [64]. В целом при развитии амилоидоза активированные астроциты могут как стимулировать нейропротекторные функции микроглии на ранних стадиях болезни Альцгеймера, так и подавлять активность клеток глии при хроническом течении заболевания.

Данные об участии клеток глии в нейровоспалении укладываются в полярную модель, отражающую дифференцировку активированных макрофагов M1 и M2 при развитии тканевого воспаления. Однако многочисленные исследования показывают, что такая аналогия не описывает сложные взаимодействия в микроглии и нейрональном окружении [65]. Так, фенотипы клеток микроглии более разнообразны, чем предполагалось, что подтверждают результаты ультраструктурных анализов [66], а также анализ активности глии в зависимости от пола, возраста и генотипа [67]. В настоящее время выделяют пять кластеров клеток данного типа, участвующих в патогенезе нейродегенеративных заболеваний [68]. Сформулирована также гипотеза о транскрипционном механизме сдвига фенотипов клеток микроглии, в которой выделяют транскрипционные факторы, опосредующие нейровоспаление (NF- κ B, активаторный белок-1, факторы IFR, опухолевый супрессор p53, STAT), поддерживающие здоровое состояние микроглии (PU-1, SALL1, MAFB) и основные факторы, необходимые для выживания и дифференцировки клеток [69].

Последний выделенный кластер кажется более значимым, он обозначен как DAM – disease-associated microglia (микроглия, связанная с болезнью). Клетки этого кластера обладают характерным профилем экспрессии генов и располагаются вблизи отложений амилоида и способствуют развитию патологических процессов, особенно на ранней стадии болезни [70]. Критическую роль в активации клеток кластера DAM играет продукция микроглией рецептора TREM2 (Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells) [71], который может использоваться в качестве биомаркера ранней стадии болезни Альцгеймера [72]. Так, блокада TREM2, снижение вариативности или нокаут рецептора в животных моделях снижают вероятность развития данной патологии, фагоцитарную активность микроглии, общую активацию и секрецию эксайтотоксичных изоформ ApoE [70, 73–75].

Нейровоспаление – это сложный и многофакторный процесс, активация глиальных клеток при котором представляет только часть нарушений, протекающих при развитии протеинопатий. На воспалительные процессы в головном мозге оказывает воздействие не только микроокружение. В процесс вовлекаются Т-хелперные клетки периферической крови, что показано на мышах линии App-Tg и пациентах с болезнью Альцгеймера [76–78], а также микробиоте кишечника [79–81]. При остром и хроническом воспалении нарушаются функции гематоэнцефалического барьера. Критическую роль в молекулярных механизмах развития патогенеза

нейровоспаления играют матриксные металлопротеиназы (ММП-3, ММП-9), вовлеченные в развитие провоспалительных реакций [82–84].

Нейровоспаление связано и с потерей нейронов при болезни Паркинсона, что обычно контролируется микроглией. Так, микроглиальная активация в черной субстанции обнаружена как при спорадической [85], так и при семейной форме болезни Паркинсона [86], а также в черной субстанции и полосатом теле трансгенных животных, моделирующих данную патологию, вызванную ингибитором комплекса I дыхательной цепи 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (MPTP) [87]. Хронически активированное или сверхактивированное состояние микроглии вызывает чрезмерные и неконтролируемые нейровоспалительные реакции за счет избыточного высвобождения свободных радикалов, что, в свою очередь, приводит к самоподдерживающемуся циклу нейродегенерации [88]. К молекулам, высвобождаемым из поврежденных дофаминергических нейронов вследствие нарушения метаболической активности дофамина и запускающим реактивный микроглиоз, относятся нейромеланин, α -синуклеин и активная форма ММП-3 [17]. Нерастворимые экстранейрональные гранулы нейромеланина обнаружены у пациентов с ювенильной идиопатической формой болезни Паркинсона [89], а также с MPTP-индуцированным паркинсонизмом [90]. Внутримозговая инъекция нейромеланина вызывает сильную активацию микроглии и потерю дофаминергических нейронов в черной субстанции [91]. Поскольку нейромеланин очень долго остается во внеклеточном пространстве [90], он считается одной из молекул, ответственных за индукцию хронического нейровоспаления при болезни Паркинсона [17]. Добавление агрегированного α -синуклеина человека к первичной культуре мезэнцефальных нейронов вызывало активацию микроглии и нейродегенерацию, причем подобная цитотоксичность не наблюдалась при отсутствии микроглии [92]. Кроме того, полученный из этих нейронов α -синуклеин стимулировал выработку модуляторов воспаления астроцитами, что усиливало активацию микроглии, хемотаксис и пролиферацию нервных клеток [93]. Gao и соавт. показано, что у трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный α -синуклеин, развивается стойкое нейровоспаление и хроническая прогрессирующая дегенерация нигростриального пути дофамина при инициации низкими уровнями липополисахаридов [94]. Более того, в ответ на окислительный стресс в дофаминергических нейронах активная форма ММП-3 вызывает активацию клеток микроглии, что, в свою очередь, приводит к образованию активных форм кислоро-

да и азота [95–99]. ММР-3 также влияет на рецепторы, активируемые протеазами, а именно, на их расщепление, удаление N-концевого домена и превращение оставшегося C-концевого домена в связывающий лиганд, который, в свою очередь, генерирует внутриклеточные сигналы и активирует микроглию [100–102]. ММР-3 также участвует в образовании интерлейкина-1бета (IL-1 β) и в экспрессии воспалительных цитокинов в активированной микроглии [84, 103, 104].

Таким образом, показана перспективность модуляции различных звеньев, связанных с нейровоспалением, воздействие на которые может вносить весомый вклад в нейропротекторное действие мультифункциональных лекарственных препаратов.

Роль митохондриального стресса при нейропатологиях

Несмотря на то что этиология многих нейродегенеративных заболеваний до сих пор остается в значительной степени неясной, в течение последних 30 лет активно обсуждается вклад митохондрий в развитие нейропатологий, и накапливаются данные, свидетельствующие о том, что важную роль в патогенезе ряда НДЗ играет именно дисфункция данных органелл. Как известно, митохондрии – важнейшие компоненты эукариотических клеток – обеспечивают их высокоэнергетическими фосфатами и продуктами промежуточного метаболизма, поддерживают гомеостаз, участвуя в регуляции баланса электролитов и поддерживая концентрацию ионов кальция. Митохондрии, регулирующие продукцию активных форм кислорода, играют ключевую роль в инициации апоптотической гибели клеток, поэтому их дисфункция может способствовать развитию ряда нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера [105–107]. Доказательства, подтверждающие правильность этой гипотезы, получены в исследованиях, описывающих митохондриальную дисфункцию (изменение морфологии и подавление метаболической активности), коррелирующую со снижением продукции АТФ и повышением уровня активных форм кислорода в мозге [107–111], фибробластах и клетках крови [112, 113] пациентов с данной нейропатологией, а также у трансгенных мышей, моделирующих болезнь Альцгеймера [106, 111, 114, 115], и в клеточных линиях, экспрессирующих мутантный белок-предшественник амилоида [116]. Известно, что при нейродегенеративных заболеваниях нарушение митохондриальных функций происходит по разным направлениям [117]. Митохондрии проходят через несколько процессов деления и слияния (укорочения и удлинения), называемые циклом

деления/слияния или «митохондриальной динамикой» [118, 119]. Возникающие дефекты в динамике данных органелл связаны с изменениями в экспрессии белков деления и слияния, что определяет их морфологию [120, 121], целостность и функциональное состояние [120, 122]. В связи с этим тонкая регуляция пяти основных белков Drp1, Fis1, Opa1, Mfn1 и Mfn2, контролирующих динамику митохондрий [123], необходима для поддержания нормальной функции органелл в клетках головного мозга. Так, анализ посмертных образцов головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера выявляет нарушение экспрессии указанных генов и, как следствие, изменение морфологии митохондрий по сравнению с митохондриями здорового человека [124]. Эти результаты находят подтверждение и в исследованиях на клеточной линии нейробластомы M17, сверхэкспрессирующей мутантную форму белка APP, где также наблюдаются изменения структуры митохондрий [113], тогда как изменения в морфологии митохондрий коры головного мозга у пожилых обезьян коррелируют с увеличением активных форм кислорода и нарушением памяти [125].

Дефекты биоэнергетики митохондрий проявляются в нарушении функционирования цепи переноса электронов, деполяризации митохондрий, увеличении продукции активных форм кислорода и снижении выработки АТФ. Локализованная во внутренней мембране митохондрий дыхательная цепь является одной из основных функциональных и структурных частей данных органелл [126], которая посредством переноса электронов между ее субъединицами катализирует образование АТФ из ADP и неорганического фосфата [127] и тем самым рассматривается как важнейший и незаменимый источник энергии в клетках млекопитающих. Известно, что в процессе преобразования энергии также происходит образование свободных радикалов [128], в результате чего в нормальных физиологических условиях образуется от 1 до 5% АФК [129], которые хоть и являются побочными продуктами митохондриального дыхания [130], служат важными окислительно-восстановительными мессенджерами в регуляции различных сигнальных путей [17]. Однако нарушения в активности даже одного из комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий (главным образом I и IV комплекса) могут привести к сверхпродукции супероксидных радикалов и других активных форм кислорода за счет интенсивного восстановления молекул кислорода [131–133], что, в свою очередь, способствует развитию окислительного стресса, необратимому повреждению компонентов клетки и, как следствие, ее гибели по митохондриальному пути апоптоза

[134, 135]. Все это усиливает дисфункцию нейронов и приводит к развитию нейродегенеративных заболеваний [136].

Нарушения функций митохондрий могут быть обусловлены действием как патологического пептида $A\beta$, который способен дестабилизировать мембраны и проникает в митохондрии с помощью транслоказ внешней (ТОМ) и внутренней мембран (ТИМ), приводя к высвобождению апоптогенных факторов, в частности, цитохрома с, активации каспаз и апоптотической гибели клеток [137], так и тау-белка [138, 139]. В результате исследования влияния тау-белка на функции и динамику митохондрий клеток нейробластомы было установлено, что патологическая форма тау-белка (P301L) приводит к дефициту комплекса I дыхательной цепи переноса электронов – NADH-убихинон-оксидоредуктазы, что сопровождается снижением концентрации АТФ и повышением восприимчивости к окислительному стрессу. Кроме того, усиленная экспрессия P301L в клетках нейробластомы приводит также к снижению подвижности митохондрий и их перинуклеарной кластеризации, в результате чего происходит активация белков Вах, увеличивающих проницаемость наружной мембраны митохондрий и вызывающих апоптоз [140]. Однако нельзя оставить без внимания и тот факт, что митохондриальная дисфункция также может предшествовать образованию патологического $A\beta$, после чего последний в агрегированном состоянии проникает через мембраны органелл и способствует дальнейшему нарушению их функционирования [141].

На *рис. 3* схематически показана роль митохондрий и окислительного стресса в развитии болезни Альцгеймера.

Митохондриальная дисфункция играет роль и в патогенезе болезни Паркинсона (*рис. 4*). Дофаминергические нейроны в черной субстанции головного мозга, которые первыми подвергаются прогрессирующему разрушению и гибели при данном заболевании, метаболически очень активны и во многом зависят от производства АТФ митохондриями. Любая патологическая ситуация, которая приводит к дисфункции митохондрий, может вызвать значительное увеличение АФК. Сверхпродукция свободных радикалов запускает перекисное окисление митохондриальных липидов, в частности кардиолипина, и приводит к высвобождению цитохрома с в цитозоль, что, в свою очередь, приводит к апоптозу. Как уже говорилось, утечка электронов после повреждения комплекса I дыхательной цепи митохондрий вызывает генерацию АФК. При внутрибрюшинном введении ингибиторов комплекса I, таких, как ротенон и 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин, трансгенным животным,

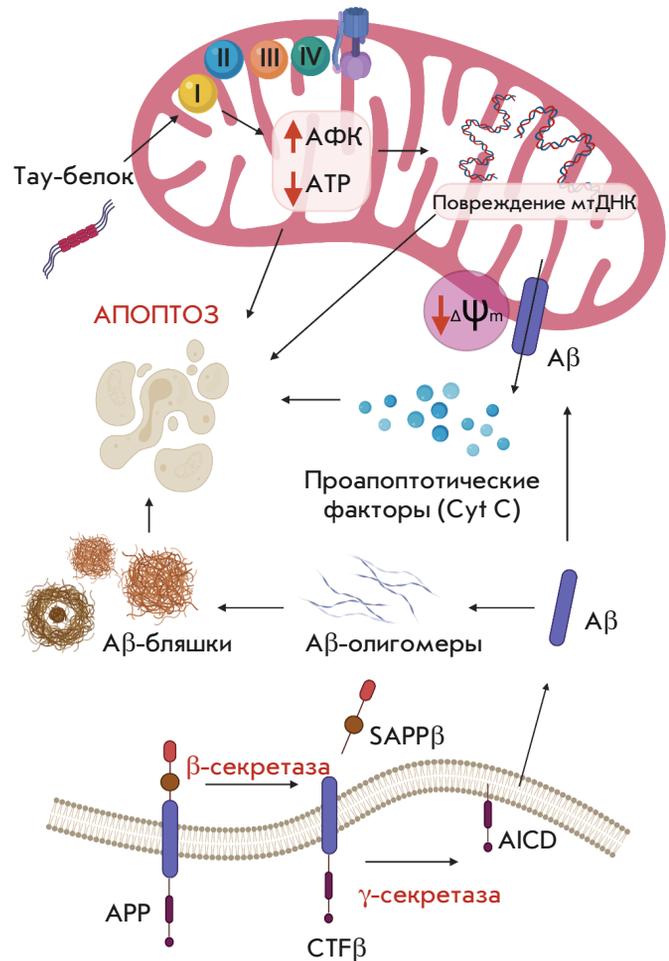


Рис. 3. Роль митохондрий и окислительного стресса в развитии болезни Альцгеймера. Митохондриальная дисфункция, вызванная действием патологических форм тау-белка и бета-амиоида ($A\beta$), приводящих к нарушениям в работе дыхательной цепи, повреждению мтДНК, гиперпродукции активных форм кислорода и снижению образования АТФ, запускает каскад апоптотической гибели нервных клеток

моделирующим болезнь Паркинсона, наблюдалась преимущественная гибель дофаминергических нейронов [142]. Установлено, что уровень дофаминергических нейронов, в митохондриях которых нарушена работа электрон-транспортной дыхательной цепи, у пациентов с болезнью Паркинсона выше, чем у людей такого же возраста, но без признаков заболевания [143]. Изучение мутаций в генах митохондриальных белков DJ-1, Parkin и PINK, связанных с наследственными и спорадическими формами болезни Паркинсона, позволило получить множество доказательств участия митохондриальной дисфункции и повреждения дофаминергических нейронов

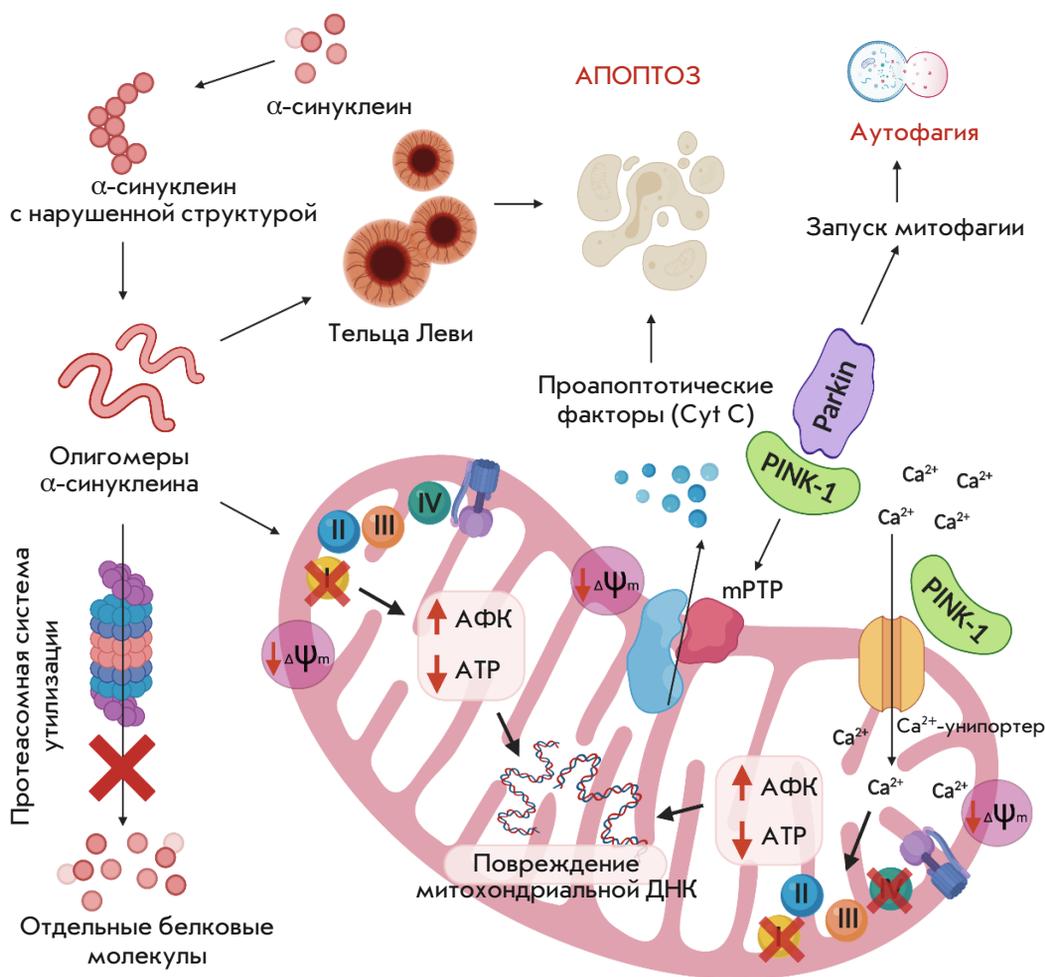


Рис. 4. Роль митохондриальной дисфункции в развитии болезни Паркинсона. Нарушения в функционировании митохондрий, вызванные сверхэкспрессией патологического α -синуклеина, мутациями в митохондриальных генах и кальциевой дисрегуляцией, приводят к изменению в работе комплексов электрон-транспортной цепи, сверхпродукции АФК, снижению содержания АТФ и, как следствие, повреждению мтДНК и запуску апоптотической гибели нейронов

в патогенезе этого заболевания. В клетках пациентов с мутацией гена *Parkin* снижена активность комплекса I [144]. У мышей с дефицитом гена *Parkin* обнаружены снижение активности дыхательной цепи в полосатом теле и различные окислительные повреждения [145]. Мутации в гене *PINK1* вызывают митохондриальную дисфункцию, включая избыточное образование свободных радикалов [146]. Со спорадической формой болезни Паркинсона связан белок DJ-1 – редокс-чувствительная атипичная пероксиредоксин-подобная пероксидаза, элиминирующая перекисные соединения путем самоокисления. Мыши с нокаутом гена *DJ-1* накапливают в клетках мозга больше АФК и имеют фрагментированный митохондриальный фенотип [147]. Choi и соавт. обнаружили, что в мозге пациентов с болезнью Паркинсона белок DJ-1 подвергается окислительному повреждению [148]. Используя двумерный гель-электрофорез и масс-спектрометрию, они идентифицировали 10 различных подтипов DJ-1 и обнаружили, что мономеры DJ-1, содержащие кислотные фрагменты, подвергаются избирательной агрегации в лобной коре

головного мозга пациентов. По-видимому, окислительное повреждение белка DJ-1 может быть связано с патогенезом спорадической формы болезни Паркинсона и может рассматриваться в качестве биомаркеров ее ранней стадии. Важную роль в развитии патологии при болезни Паркинсона отводят α -синуклеину – цитозольному белку, который способен взаимодействовать с митохондриальными мембранами и ингибировать комплекс I митохондриальной дыхательной цепи, как показано на рис. 4 [149]. Так, у мышей с избыточной экспрессией мутантного α -синуклеина обнаруживаются нарушения в структуре и функциях митохондрий [150]. Предполагается также, что развитию окислительного стресса и дисфункции митохондрий при болезни Паркинсона может способствовать кальциевая дисрегуляция [151, 152]. Это связано с тем, что компактный слой черной субстанции дофаминергических нейронов включает ионные каналы L-типа, нарушение работы которых позволяет внеклеточному кальцию бесконтрольно проникать в цитоплазму [153] и тем самым усиливать метаболизм дофамина, смещая цитозольную

концентрацию нейромедиатора в токсический диапазон L-ДОФА [154]. В частности, Surmeier и соавт. показали, что постоянное открытие кальциевых каналов L-типа в дофаминергических нейронах черной субстанции вызывает окислительный стресс, а также приводит к колебаниям митохондриального потенциала, который связан с нарушением продукции АТФ, что в конечном итоге запускает процессы, связанные с клеточной гибелью [155]. Исрадипин – антагонист кальциевых каналов L-типа, может ослаблять индуцированную ротеноном потерю дендритов (показано на срезах среднего мозга взрослого человека), а также ослаблять вызванную МРТР нейродегенерацию дофаминергических нейронов у мышей [156].

Нарушение функционирования митохондрий приводит и к снижению способности данных органелл регулировать внутриклеточный гомеостаз кальция и запускать процесс скачка митохондриальной проницаемости [157]. Иными словами, увеличение уровня кальция в клетке может провоцировать появление дегенеративных изменений, приводить к значительно большей вероятности запуска процесса скачка митохондриальной проницаемости с последующим каскадом гибели клеток по пути апоптоза и некроза [158]. Что немаловажно, повышенный уровень кальция способен приводить к сверхпродукции активных форм кислорода и окислительному стрессу [159]. Увеличение количества кальция в нейронах трансгенных мышей 3xTg-AD показано в работе Lopez и соавт. [160]. Кроме того, митохондриальная дисфункция, связанная с нарушением кальциевого гомеостаза, описана при нейродегенеративных патологиях, в частности при болезни Хантингтона [161]. В митохондриях из мозга трансгенных мышей, моделирующих болезнь Хантингтона, и лимфоцитов пациентов с болезнью Хантингтона выявлены ярко выраженные дефекты кальциевой регуляции [162]. Кроме того, нарушение митохондриальных функций наблюдали и в клеточных моделях этого заболевания [161, 163–165], и, что немаловажно, применение ингибиторов проницаемости митохондриальной мембраны, препятствующих нейрональной гибели, таких, как бонгкрековая кислота, нортриптилин, дезипрамин, трифлуоперазин и мапротилин, оказывает нейропротекторный эффект на животных, моделирующих данную патологию [163]. Поражение митохондрий наблюдается и в нейронах пациентов с болезнью Альцгеймера, что сопровождается деполаризацией их мембраны, снижением способности связывать ионы Ca^{2+} , сверхпродукцией активных форм кислорода и окислительным повреждением митохондриальной ДНК [166].

Перспективность использования митопротекторов при нейродегенеративных заболеваниях подтверж-

дена и результатами изучения биоизостерных аналогов коричной кислоты и полиметоксибензолов в качестве потенциальных нейропротекторов. Обнаружена высокая способность нескольких соединений ингибировать кальций-индуцированное открытие поры скачка митохондриальной проницаемости (более 50%). Такая митопротекторная активность рассматривается в качестве механизма нейропротекторного эффекта данных соединений и коррелирует с наличием цитопротекторного потенциала на клеточной модели нейродегенерации, связанной с кальциевым стрессом – иономицин-индуцированной нейротоксичности [46]. Подобной способностью обладают и тетрагидро-гамма-карболины – структурные аналоги отечественного препарата Димебон. Эти вещества в большей степени ингибировали кальций-индуцированный скачок митохондриальной проницаемости, чем исходный Димебон. Так, ранее установили, что Димебон снижает скорость набухания митохондрий в среднем на 20% [167], в то время как соединение DF-407 уменьшало данный показатель практически в 2 раза. В первых исследованиях влияния тетрагидро-гамма-карболинов на выживаемость нейронов коры головного мозга новорожденных крыс в условиях глутамат-индуцированной токсичности показано значимое снижение гибели клеток, обработанных этими соединениями, что может быть обусловлено их митопротекторными свойствами [47]. Преинкубация митохондрий мозга крыс с алломаргаритарином – аддуктом, полученным из секуринина и триптамина, дозозависимо ингибирует Ca^{2+} -индуцированный скачок митохондриальной проницаемости, а также эффективно подавляет его при использовании в качестве индуктора A β 35-25, и, как следствие, обладает цито(нейро)протекторной активностью в моделях эксайтотоксичности и токсичностей, опосредованных ионами трехвалентного железа и амилоидом [41, 42, 168]. Кроме того, алломаргаритарин обладает способностью снижать агрегацию A β [169].

Таким образом, митохондрии являются перспективной мишенью при поиске потенциальных нейропротекторных агентов, нацеленных на предотвращение или замедление развития нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера.

Гистондеацетилазы (HDAC) как потенциальная молекулярная мишень действия нейропротекторных агентов

В последнее время помимо основных признаков болезни Альцгеймера – образования токсических β -амилоидных агрегатов и нейрофибриллярных клубков – все большее значение приобретают механизмы эпигенетической регуляции [170, 171].

Эпигенетические изменения обратимы, не затрагивают модификаций нуклеотидной последовательности ДНК и могут поддаваться фармакологической коррекции. Хромосомная ДНК упакована в компактную структуру с помощью гистонов, относительно небольших белков с очень большой долей положительно заряженных аминокислотных остатков (лизина и аргинина). Положительный заряд помогает гистонам связываться с ДНК (которая заряжена отрицательно) независимо от ее нуклеотидной последовательности. В клетке гистоны выполняют две основные функции: участвуют в упаковке ДНК в ядре и в эпигенетической регуляции таких процессов, как транскрипция, репликация и репарация [172]. Гистоны подвергаются посттрансляционным модификациям – ацетилированию, деацетилированию, фосфорилированию, метилированию. Ацетилирование и деацетилирование гистонов регулируются активностью гистондеацетилаз (HDAC) и гистон-ацетилтрансфераз (HAT) [173, 174]. Эти процессы играют решающую роль в изменении структуры хроматина и, как следствие, регулируют экспрессию генов, процессы выживания клеток и их дифференцировки [175].

Существует два основных подсемейства HDAC: «цинкзависимые» классические гистондеацетилазы и «никотинамидадениндинуклеотид (NAD⁺)-зависимые» белки сиртуины (SIRT), которые иногда называют HDAC класса III. В зависимости от сходства цинкзависимые HDAC разделяют на четыре различных класса (I, II (IIa и IIb), III и IV), которые отличаются структурой, ферментативными функциями, субклеточной локализацией и местами экспрессии (таблица) [176]. На сегодняшний день у млекопитающих выявлено 18 деацетилаз. Биологические функции отдельных изоформ HDAC трудно определить из-за отсутствия специфических ингибиторов.

Известно, что при нейродегенеративных патологиях нарушается соотношение уровней гистондеацетилаз и гистон-ацетилтрансфераз, строго регулируемое в здоровых нейронах [177]. При болезни Альцгеймера наблюдается чрезмерная экспрессия HDAC6, что сопровождается образованием аномального белка-предшественника APP, аккумуляцией Aβ, Aβ-опосредованным гиперфосфорилированием тау-белка, дегенерацией холинергических нейронов и, как следствие, тяжелыми когнитивными расстройствами (рис. 5) [178]. Известно, что нейродегенеративные заболевания сопровождаются нарушениями регуляции транскрипции, приводящими к гибели нервных клеток, поэтому HDAC считаются весьма перспективными мишенями для фармакологической коррекции нейропатологий [179], в том числе и за счет потенциальной обратимости таких эпигенетических модификаций [180].

Классификация гистондеацетилаз

Семейство HDAC		
Тип	Кофактор	Локализация
<i>Класс I</i>		
HDAC1	Zn ²⁺	Ядро
HDAC2		Ядро
HDAC3		Ядро/цитоплазма
HDAC8		Ядро
<i>Класс II</i>		
<i>Подкласс IIa</i>		
HDAC4	Zn ²⁺	Ядро/цитоплазма
HDAC5		Ядро/цитоплазма
HDAC7		Ядро/цитоплазма
HDAC9		Ядро/цитоплазма
<i>Подкласс IIb</i>		
HDAC6	Zn ²⁺	Цитоплазма
HDAC10		Цитоплазма
<i>Класс III Сиртуины</i>		
Sir1	NAD ⁺	Ядро
Sir2		Ядро
Sir3		Ядро/цитоплазма
Sir4		Митохондрии
Sir5		Митохондрии
Sir6		Митохондрии
Sir7		Ядро
Sir8		Ядрышко
<i>Класс IV</i>		
HDAC11	Zn ²⁺	Ядро

Nahnen и соавт. рассматривают участие ингибиторов гистондеацетилаз (HDACi) в регуляции эпигенетических моментов развития целого ряда нейродегенеративных процессов. Считается, что ингибиторы гистондеацетилаз, которые исходно использовали в качестве противоопухолевых средств, могут быть эффективны при нейродегенеративных расстройствах, в частности при болезни Альцгеймера [181]. Результаты многочисленных работ, в которых изучали влияние различных соединений на HDAC, показывают, что нейропротекторный эффект ингибиторов гистондеацетилаз реализуется путем подавления продукции Aβ [182, 183] и, как следствие, Aβ-индуцированного гиперфосфорилирования тау-белка [184, 185]. Использование ингибитора гистондеацетилаз энтиноста (entinostat) для лечения трансгенных мышей APP/PS1, моделирующих болезнь Альцгеймера, приводит к усилению активации микроглии и уменьшению отложений Aβ [186]. Применение препарата субероиланилида гидроксамовой кислоты (SANA) в экспериментах на 20-месячных мышках с возрастными нарушениями памяти

показывает, что SAHA улучшает пространственную память. При этом у пожилых мышей обнаруживается снижение уровня гистона H4K12ac в гиппокампальной области CA1, в то время как SAHA приводит одновременно к экспрессии ацетилированных гистонов, а также стимулирует активность NMDA-рецепторов в гиппокампе [187].

У мышей со сверхэкспрессией HDAC2, но не HDAC1, наблюдаются снижение синаптической пластичности, количества образующихся синапсов и нарушения формирования памяти, в то время как Вориностат (ингибитор HDAC) может восстанавливать синаптическую пластичность и улучшать обучаемость и память [188]. Akhtar и соавт. показали, что повышенный уровень HDAC2 в зрелых нейронах влияет на основную возбуждающую нейротрансмиссию, подразумевая участие HDAC2 в синаптической пластичности [189]. McQuown и соавт. обнаружили, что у HDAC3-Flox-модифицированных мышей (делеция HDAC3 в гиппокампальной области CA1) или у мышей, обработанных селективным ингибитором HDAC3 RGFP136, усиливается процесс ацетилирования гистонов и значительно улучшается долговременная память [190]. Кроме того, Vardai и соавт. предположили, что HDAC3 является белком с собственной сильной нейротоксической активностью, а его токсический эффект – клеточно-селективным. HDAC3 напрямую фосфорилируется GSK-3 β , а ингибирование GSK-3 β защищает от HDAC3-индуцированной нейротоксичности [191]. HDAC6, локализованный главным образом в цитоплазме, катализирует некоторые негистоновые белки, такие, как тубулин и деацетилаза HSP90 [192, 193].

Уровень белка HDAC6 в коре и гиппокампе пациентов с болезнью Альцгеймера значительно выше, чем в мозге здоровых людей. Тубацин (селективный ингибитор HDAC6) ослабляет сайт-специфическое фосфорилирование тау-белка [194] и усиливает движение митохондрий в нейронах гиппокампа, а GSK-3 β участвует в регуляции активности HDAC6 путем его фосфорилирования [195]. Селективное ингибирование HDAC6 защищает от нейродегенерации, вызванной окислительным стрессом, и способствует разрастанию нейритов в корковых нейронах [196]. HDAC4 также может играть важную роль в функционировании нервных клеток. Этот фермент в основном локализуется в цитоплазме клеток головного мозга, а аномальная экспрессия локализованного в ядре HDAC4 способствует апоптозу нейронов, в то время как его инактивация подавляет гибель клеток [197].

В последнее время появляются данные о роли сиртуинов в развитии нейродегенеративных забо-

леваний. Обнаружено значительное снижение Sir1 в теменной коре пациентов с болезнью Альцгеймера по сравнению с контролем, в связи с чем накопление A β и тау-белков может быть связано с потерей функции Sir1 [198]. Кроме того, нарушения памяти и синаптической пластичности обнаруживаются и у мутантных мышей с отсутствием Sir1 [199]. Избыточная экспрессия NAD⁺-зависимой деацетилазы Sir1 в мышечной модели болезни Альцгеймера также снижает продукцию A β и образование бляшек посредством активации транскрипции гена *ADAM10*, кодирующего α -секретазу [200]. Нокаунт Sir3 увеличивает генерацию митохондриальных активных форм кислорода в оплодотворенных яйцеклетках мышей, а образование митохондриальных АФК сопровождается повышением уровня белка p53 [201]. Кроме того, обработка первичных культур нейронов коры мозга мышей глутаматом индуцирует чрезмерную выработку АФК, а также увеличение уровня митохондриального Sir3, в то время как сверхэкспрессия Sir3 значительно снижает образование митохондриальных АФК. По-видимому, Sir3 участвует в защите нервных клеток от окислительного стресса и эксайтотоксичности [202].

Накопленные данные подтверждают мнение, что белки HDAC вовлечены в развитие нейродегенеративных заболеваний. HDAC регулируют уровень ацетилирования гистонов и, как следствие, влияют на экспрессию некоторых генов, участвующих в формировании памяти, синаптической пластичности и в других процессах, необходимых для нормального функционирования клеток головного мозга. Ингибиторы HDAC могут уменьшать когнитивный дефицит в моделях животных с нейродегенеративными расстройствами. Потенциальные пути действия ингибиторов HDAC заключаются в подавлении A β -индуцированного гиперфосфорилирования тау-белка, а также в регуляции экспрессии генов, которые участвуют в обучении и памяти (рис. 5). Рассматривается возможность фармакологической коррекции нейродегенеративных заболеваний с использованием ингибиторов HDAC, однако остается ряд нерешенных проблем. Большинство известных в настоящее время ингибиторов гистондеацетилаз относятся к пан-селективным, т.е. действующим против всех типов HDAC, что вызывает массовые изменения в экспрессии генов и приводит к многочисленным побочным эффектам [203], поскольку HDAC участвуют как в процессах выживания, так и гибели клеток. Поэтому для разработки селективных ингибиторов HDAC, обладающих низкой токсичностью по отношению к нормальным клеткам, необходимо выяснить точную роль отдельных представителей семейства HDAC при различных нейропатологиях.

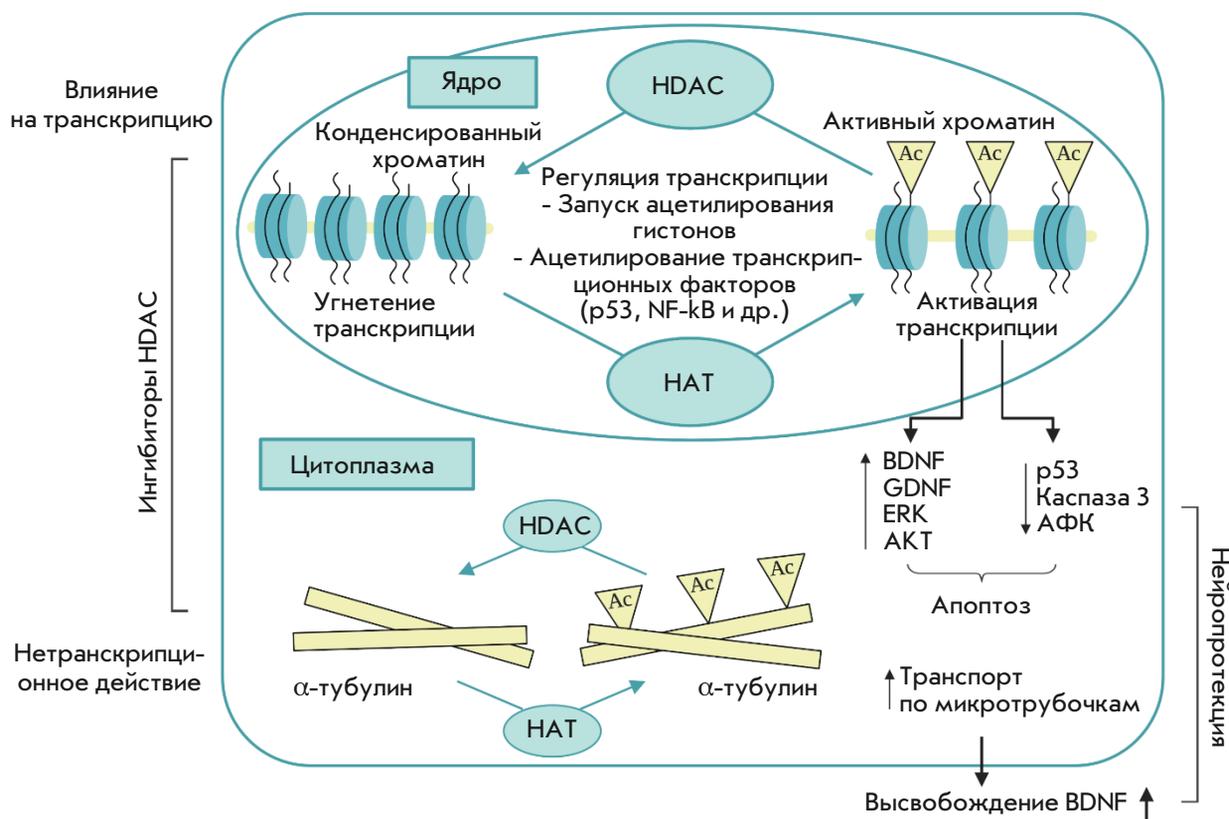


Рис. 5. Действие ингибиторов HDAC в клетке при нейродегенеративных заболеваниях. Нарушение гомеостаза ацетилирования приводит к гипоацетилированию гистонов и, как следствие, к aberrантной транскрипционной активности. Ингибирование активности HDAC вызывает транскрипционные и нетранскрипционные эффекты. Ацетилирование гистоновых белков в промоторах генов, а также транскрипционных факторов может увеличивать экспрессию множества генов, которые способствуют нейропротекции, пластичности и обучению /памяти. Нетранскрипционное действие ингибиторов HDAC приводит к гиперацетилированию и стабилизации белков микротрубочек, увеличению везикулярного транспорта и высвобождению BDNF

Агрегация патогенных форм белка как ключевая мишень при поиске лекарственных средств, эффективных при нейропатологиях

Привлечение в биомедицину новейших клеточных технологий, биоинформатических подходов и методов направленной манипуляции с геномом лабораторных животных привело к бурному прогрессу в этой области и позволило по-новому классифицировать фундаментальные процессы, лежащие в основе нейродегенерации. В результате был пересмотрен ряд концепций и предложены изменения в классификацию нейродегенеративных заболеваний. Установлено, что целый ряд различных по клинической картине нейродегенеративных заболеваний имеет сходный молекулярный механизм патогенеза, в основе которого лежит патологическая агрегация белков, приводящая к развитию протеинопатии [204, 205]. При многих нейродегенеративных заболеваниях

в тканях нервной системы находят патологические включения различного типа [206]. Выявлен каскадный характер сложного механизма формирования обнаруживаемых включений, идентифицированы молекулярно-клеточные события, происходящие на основных этапах этого патологического процесса [207, 208]. Например, при болезни Паркинсона одним из первых выявлен ген *SNCA*, кодирующий α-синуклеин – короткий цитоплазматический белок (140 аминокислот – у человека), который синтезируется преимущественно в нервной системе и локализуется в пресинаптических окончаниях [209–211]. Наиболее характерными гистопатологическими признаками болезни Паркинсона являются тельца Леви в дофаминергических нейронах черной субстанции и дистрофические нейриты в тракте, ведущем от черной субстанции к полосатому телу, в состав которых входят агрегаты различных белков [212, 213].

При этом ключевую роль в формировании этих отложений играет фибриллярная форма α -синуклеина, обладающая уникальными физико-химическими свойствами [214, 215]. Стоит отметить, что формирование телец Леви в нейронах коры головного мозга также приводит к заболеваниям, которые вынесены в отдельную группу деменций. Например, при множественной системной атрофии образуются цитоплазматические и ядерные отложения в нейронах и олигодендрокитах [216–218].

Мутации в трех генах – *APP*, *PSEN1*, *PSEN2* (пресенилины 1 и 2), приводят к развитию наследственных форм болезни Альцгеймера с ранней манифестацией (клинические симптомы появляются до достижения возраста 65 лет) [219, 220]. При этом семейные и спорадические формы болезни Альцгеймера сходны: в нервных тканях больных содержатся белковые агрегаты двух типов – амилоидные бляшки и нейрофибриллярные клубки, основными компонентами которых являются $A\beta$ и гиперфосфорилированные формы белка тау соответственно. Так, гипотеза превращения нетоксичных мономеров $A\beta$ в его токсичные олигомеры [221], которые могут взаимодействовать с несколькими постсинаптическими компонентами, включая глутаматергические рецепторы (N-methyl-D-aspartate (NMDA) и метаботропный глутаматный рецептор 5 (mGluR5)), прионный белок, рецептор нейротрофина и A7-никотиновый холинорецептор A7 [222] и способствуя синаптическому повреждению, является одной из преобладающих при объяснении порядка патогенных событий, приводящих к нейродегенерации. Известно, что олигомеры $A\beta$ могут образовывать каналы, приводящие к нарушению мембранной проницаемости и, как следствие, кальциевого гомеостаза, что в свою очередь индуцирует гибель нейронов [223, 224]. Точно так же токсичные олигомеры $A\beta$ могут модулировать активность глутаматных NMDA-рецепторов [225], ослаблять mGluR-зависимые механизмы [226], вызывая нарушения в рециркуляции синаптического глутамата, способствуя депрессии синапса и негативно влияя на синаптическую пластичность [227].

Показано также, что олигомерная форма $A\beta$ активирует экstrasинаптические NMDA-рецепторы на нейронах, что, в свою очередь, приводит к гиперфосфорилированию тау-белка, активации каспазы-3, продукции монооксида азота (NO) и синаптической депрессии [228], а ингибирование данного подтипа глутаматных рецепторов защищает синапсы от $A\beta$ -индуцированного повреждения и, по-видимому, устраняет нарушения памяти [229, 230], что наглядно подтверждает потенциал использования модуляторов данного процесса.

Несмотря на то что точные молекулярные механизмы развития нейродегенерации до сих пор остаются неясными, гиперфосфорилированию тау-белка отводится одна из ключевых ролей в патогенезе данной патологии. В значительной степени белок тау вовлечен в вышеупомянутые процессы, действующие параллельно или в сочетании с $A\beta$ [231]. Так, на модели тау-индуцированной нейродегенерации показано, что аномально фосфорилированный белок инициирует связывание и стабилизацию нитевидного актина, что приводит к митохондриальной дисфункции и окислительному стрессу, повреждению ДНК и, в конечном итоге, к апоптозу [232]. Снижение уровня тау-белка защищало как трансгенных, так и не-трансгенных мышей от эксайтотоксичности и восстанавливало функцию памяти в модели таупатии [233].

Тау-белок не имеет жесткой трехмерной структуры [234]. Однако укорочение и гиперфосфорилирование может вызывать множественные патологические изменения в его структуре и приводить к образованию нерастворимых парных спиральных филаментов и более крупных агрегатов [234–238]. В первую очередь такие трансформации приводят к утрате физиологической функции нативного белка (участие в сборке мономеров тубулина в микротрубочки), а во вторую – к токсическому эффекту по отношению к клеткам мозга [234, 235].

В связи с тем, что тау-белок играет важную роль в физиологической динамике микротрубочек и тем самым в обеспечении нормального функционирования клеток [239], интерес исследователей вызывает разработка лекарственных препаратов, действующих на данный белок. Так, углубленное изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе патологических трансформаций тау-белка, открывает возможность специфического воздействия на патологические модификации тау с терапевтическими целями. На данный момент существует несколько подходов к созданию таких агентов, которые прямо или опосредованно действуют на каскад тау-белка: соединения, которые предотвращают или обращают вспять агрегацию тау [240–242], низкомолекулярные лекарственные средства, которые ингибируют киназы или активируют фосфатазы тау-белка [243, 244], вещества, стабилизирующие микротрубочки [245], лекарственные средства, которые способствуют протеолитической деградации неправильно свернутых тау-белков [239, 246, 247], и иммунодепрессивные агенты [234], а также стратегии, направленные на активную и пассивную иммунизацию [234, 248, 249].

Показано, что существуют моноклональные антитела, которые способны различать изоформы тау-белка и по-разному действовать на нативный и трансформированный белок. Taniguchi и соавт.

показали, что моноклональные антитела RTA-1 и RTA-2, специфически связывающиеся с частями R1 или R2 тау-белка, препятствовали образованию спиральных филаментов *in vitro*, одновременно стимулируя индуцируемую тау-белком сборку тубулина [250]. Несмотря на существование по меньшей мере трех вакцин, действующих на разные патогенные формы A β и находящихся на клинических испытаниях, в настоящее время нет данных о результатах испытаний. При этом на трансгенной линии животных, мутантных по APP и моделирующих болезнь Альцгеймера, показана эффективность активной иммунизации, которая приводит к уменьшению отложений A β и, как следствие, к нивелированию сопутствующих повреждений головного мозга [251–253]. В работе Asuni и соавт. показано, что активная иммунизация эпитопом фосфорилированного тау-белка мышцей трансгенной линии, экспрессирующей P301L-мутантный тау в нейронах, уменьшает количество агрегированного белка в головном мозге и замедляет прогрессирование связанного с данной патологией поведенческого фенотипа [254, 255]. Следует также отметить значительную корреляцию между показателями двигательной активности, полученными в поведенческих тестах, и патологией тау в двигательной коре и стволе головного мозга, которые играют заметную роль в координации движений. Это указывает на прямую связь между основным патологическим признаком данной модели и связанными с ним функциональными нарушениями [255], а также свидетельствует о том, что иммунотерапевтические подходы, нацеленные на патологическую форму тау, представляют собой перспективный подход к лечению и/или диагностике различных таупатий, в частности болезни Альцгеймера.

Похожие параллели можно провести и для ряда других заболеваний. При боковом амиотрофическом склерозе в аутопсийном материале больных находят отложения, содержащие белки FUS, TDP-43, OPTN, UBQLN2, а также продукты трансляции интронных повторов в гене C9ORF72 [256, 257]. У больных хореей

Хантингтона, обусловленной экспансией тринуклеотидного CAG-повтора в гене гентингина, в нейронах накапливаются полиглутаминовые отложения [258, 259]. Несмотря на различие в функциях патогенных белков, склонность к агрегации является общей чертой широкого круга нейродегенеративных заболеваний, поэтому агрегацию патогенных форм белков можно рассматривать в качестве ключевой терапевтической мишени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение многочисленных гипотез, предложенных для точного определения конкретного источника любого нейродегенеративного расстройства, не позволяет выявить их первопричину. Поэтому следует учитывать множественность (совокупность) факторов в контексте этиологии нейродегенеративных заболеваний, и это, возможно, тот случай, когда любой набор мутаций или факторов, начиная с нейровоспалительных процессов и заканчивая агрегацией белков в нейрональных клетках, приводит к последовательному накоплению целого клубка молекулярных патологий. Таким образом, основополагающим аспектом при разработке новых препаратов должна стать многофакторность их терапевтического эффекта. Подобные препараты должны обладать мультитаргетным действием, пусть и незначительным на какую-либо из перечисленных молекулярных мишеней, но, тем не менее, воздействовать на максимально возможное количество мишеней. Принимая во внимание результаты исследований, направленных на выяснение первопричин нейродегенеративных заболеваний, можно сказать, что мы только начинаем открывать комбинации ключевых факторов, совокупность которых является причиной нейродегенеративного процесса. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-73-10195 и в рамках Государственного задания ИФАВ РАН 2020 года (тема № 0090-2019-0006).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Деменция. Информационный бюллетень. Всемирная организация здравоохранения. 2019. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Дата обращения 20.01.2020.
2. McDade E., Bateman R.J. // *Nature*. 2017. V. 547. № 7662. P. 153–155. doi: 10.1038/547153a.
3. Bachurin S.O., Bovina E.V., Ustyugov A.A. // *Med. Res. Rev.* 2017. V. 37. № 5. P. 1186–1225. doi: 10.1002/med.21434.
4. Bachurin S.O., Gavrilova S.I., Samsonova A., Barreto G.E., Aliev G. // *Pharmacol. Res.* 2018. V. 129. P. 216–226. doi: 10.1016/j.phrs.2017.11.021.
5. Reddy P.H., Reddy T.P. // *Curr. Alzheimer Res.* 2011. V. 8. № 4. P. 393–409. doi: 10.2174/156720511795745401.
6. Swerdlow R.H., Khan S.M. // *Med. Hypotheses*. 2004. V. 63. № 1. P. 8–20. doi: 10.1016/j.mehy.2003.12.045.
7. Moran M., Moreno-Lastres D., Marin-Buera L., Arenas J., Martin M.A., Ugalde C. // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. V. 53. № 3. P. 595–609. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.009.
8. Zhu L., L Z., Song Y.Y. // *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2015. V. 37. № 4. P. 482–488. doi: 10.3881/j.issn.1000-503X.2015.04.020.
9. Chiurchiu V., Orlacchio A., Maccarrone M. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. V. 2016. P. 7909380. doi: 10.1155/2016/7909380.

10. El-Bacha R.S., De-Lima-Filho J.L., Guedes R.C. // *Nutr. Neurosci.* 1998. V. 1. № 3. P. 205–212. doi: 10.1080/1028415X.1998.11747230.
11. Mandel S., Grunblatt E., Riederer P., Gerlach M., Levites Y., Youdim M.B. // *CNS Drugs.* 2003. V. 17. № 10. P. 729–762. doi: 10.2165/00023210-200317100-00004.
12. von Arnim C.A., Gola U., Biesalski H.K. // *Nutrition.* 2010. V. 26. № 7–8. P. 694–700. doi: 10.1016/j.nut.2009.11.009.
13. Yu Y.C., Kuo C.L., Cheng W.L., Liu C.S., Hsieh M. // *J. Neurosci. Res.* 2009. V. 87. № 8. P. 1884–1891. doi: 10.1002/jnr.22011.
14. Zuo L., Zhou T., Pannell B.K., Ziegler A.C., Best T.M. // *Acta Physiol. (Oxf.)*. 2015. V. 214. № 3. P. 329–348. doi: 10.1111/apha.12515.
15. Mosley R.L., Benner E.J., Kadiu I., Thomas M., Boska M.D., Hasan K., Laurie C., Gendelman H.E. // *Clin. Neurosci. Res.* 2006. V. 6. № 5. P. 261–281. doi: 10.1016/j.cnr.2006.09.006.
16. Rego A.C., Oliveira C.R. // *Neurochem. Res.* 2003. V. 28. № 10. P. 1563–1574. doi: 10.1023/a:1025682611389.
17. Bhat A.H., Dar K.B., Anees S., Zargar M.A., Masood A., Sofi M.A., Ganie S.A. // *Biomed. Pharmacother.* 2015. V. 74. P. 101–110. doi: 10.1016/j.biopha.2015.07.025.
18. Gan L., Johnson J.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1842. № 8. P. 1208–1218. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.12.011.
19. Dias V., Junn E., Mouradian M.M. // *J. Parkinsons Dis.* 2013. V. 3. № 4. P. 461–491. doi: 10.3233/JPD-130230.
20. St-Pierre J., Drori S., Uldry M., Silvaggi J.M., Rhee J., Jager S., Handschin C., Zheng K., Lin J., Yang W., et al. // *Cell.* 2006. V. 127. № 2. P. 397–408. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.024.
21. Gill S.S., Rochon P.A., Herrmann N., Lee P.E., Sykora K., Gunraj N., Normand S.-L.T., Gurwitz J.H., Marras C., Wodchis W.P., et al. // *BMJ.* 2005. V. 330. № 7489. P. 445. doi: 10.1136/bmj.38330.470486.8F.
22. Lermontova N., Lukoyanov N., Serkova T., Lukoyanova E., Bachurin S. // *Mol. Chem. Neuropathol.* 1998. V. 33. № 1. P. 51–61. doi: 10.1007/bf02815859.
23. Berg D., Youdim M.B., Riederer P. // *Cell Tissue Res.* 2004. V. 318. № 1. P. 201–213. doi: 10.1007/s00441-004-0976-5.
24. Halliwell B. // *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 1989. V. 126. P. 23–33. doi: 10.1111/j.1600-0404.1989.tb01779.x.
25. Cohen G. // *Oxygen Radicals Tissue Injury.* 1988. P. 130–135.
26. Greilberger J., Koidl C., Greilberger M., Lamprecht M., Schroecksnadel K., Leblhuber F., Fuchs D., Oetli K. // *Free Radic. Res.* 2008. V. 42. № 7. P. 633–638. doi: 10.1080/10715760802255764.
27. Dalfo E., Portero-Otin M., Ayala V., Martinez A., Pamplona R., Ferrer I. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005. V. 64. № 9. P. 816–830. doi: 10.1097/01.jnen.0000179050.54522.5a.
28. Selley M.L., Close D.R., Stern S.E. // *Neurobiol. Aging.* 2002. V. 23. № 3. P. 383–388. doi: 10.1016/s0197-4580(01)00327-x.
29. Bosco D.A., Fowler D.M., Zhang Q., Nieva J., Powers E.T., Wentworth P., Jr, Lerner R.A., Kelly J.W. // *Nat. Chem. Biol.* 2006. V. 2. № 5. P. 249–253. doi: 10.1038/nchembio782.
30. Nakabeppu Y., Tsuchimoto D., Yamaguchi H., Sakumi K. // *J. Neurosci. Res.* 2007. V. 85. № 5. P. 919–934. doi: 10.1002/jnr.21191.
31. Zeevalk G.D., Razmpour R., Bernard L.P. // *Biomed. Pharmacother.* 2008. V. 62. № 4. P. 236–249. doi: 10.1016/j.biopha.2008.01.017.
32. Thannickal T.C., Lai Y.Y., Siegel J.M. // *Brain.* 2008. V. 131. № 1. P. e87. doi: 10.1093/brain/awm221.
33. Sano M., Ernesto C., Thomas R.G., Klauber M.R., Schafer K., Grundman M., Woodbury P., Growdon J., Cotman C.W., Pfeiffer E., et al. // *N. Engl. J. Med.* 1997. V. 336. № 17. P. 1216–1222. doi: 10.1056/NEJM199704243361704.
34. Golbe L.I., Farrell T.M., Davis P.H. // *Arch. Neurol.* 1988. V. 45. № 12. P. 1350–1353. doi: 10.1001/archneur.1988.00520360068014.
35. May J.M. // *Subcell Biochem.* 2012. V. 56. P. 85–103. doi: 10.1007/978-94-007-2199-9_6.
36. Kojo S. // *Curr. Med. Chem.* 2004. V. 11. № 8. P. 1041–1064. doi: 10.2174/0929867043455567.
37. Olabisi A.O. The chemistry of *L*-ascorbic acid derivatives in the asymmetric synthesis of C2 and C3-substituted aldono-galactones. Ph.D. Dissertation, 2005. College of Liberal Arts and Sciences, Wichita State University, Wichita.
38. Harikumar K.B., Aggarwal B.B. // *Cell Cycle.* 2008. V. 7. № 8. P. 1020–1035. doi: 10.4161/cc.7.8.5740.
39. Venturini C.D., Merlo S., Souto A.A., Fernandes Mda C., Gomez R., Rhoden C.R. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2010. V. 3. № 6. P. 434–441. doi: 10.4161/oxim.3.6.14741.
40. Yao Z., Drieu K., Papadopoulos V. // *Brain Res.* 2001. V. 889. № 1–2. P. 181–190. doi: 10.1016/s0006-8993(00)03131-0.
41. Neganova M.E., Klochkov S.G., Afanasieva S.V., Serkova T.P., Chudinova E.S., Bachurin S.O., Reddy V.P., Aliev G., Shevtsova E.F. // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2016. V. 15. № 1. P. 102–107. doi: 10.2174/18715273146666150821111812.
42. Neganova M.E., Serkova T.P., Klochkov S.G., Afanasieva S.V., Shevtsova E.F., Bachurin S.O. // *Nat. Techn. Sci.* 2011. V. 5. № 55. P. 86–90.
43. Neganova M.E., Blik V.A., Klochkov S.G., Chepurnova N.E., Shevtsova E.F. // *Neurochem. J.* 2011. V. 5. P. 208.
44. Kann O., Kovacs R. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2007. V. 292. № 2. P. C641–657. doi: 10.1152/ajpcell.00222.2006.
45. Kovacs R., Schuchmann S., Gabriel S., Kann O., Kardos J., Heinemann U. // *J. Neurophysiol.* 2002. V. 88. № 6. P. 2909–2918. doi: 10.1152/jn.00149.2002.
46. Neganova M.E., Semenov V., Semenova M., Redkozubova O.M., Aleksandrova Y.R., Lysova E.A., Klochkov S.G., Shevtsova E.F. // *Biomed. Chem. Res. Methods.* 2018. V. 1. № 3. P. e00052.
47. Виноградова Д.В., Неганова М.Е., Серкова Т.П., Шевцова Е.Ф. // *Естественные и технические науки.* 2013. Т. 6. № 68. С. 73–78.
48. Kozin S.A., Makarov A.A. // *Mol. Biol. (Mosk.)*. 2019. V. 53. № 6. P. 1020–1028. doi: 10.1134/S0026898419060107.
49. Bennett C., Mohammed F., Alvarez-Ciara A., Nguyen M.A., Dietrich W.D., Rajguru S.M., Streit W.J., Prasad A. // *Biomaterials.* 2019. V. 188. P. 144–159. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.09.040.
50. Niranjana R. // *Neurochem. Int.* 2018. V. 120. P. 13–20. doi: 10.1016/j.neuint.2018.07.003.
51. Kim Y.S., Jung H.M., Yoon B.E. // *Anim. Cells Syst. (Seoul)*. 2018. V. 22. № 4. P. 213–218. doi: 10.1080/19768354.2018.1508498.
52. Merlo S., Spampinato S.F., Caruso G.I., Sortino M.A. // *Curr. Neuropharmacol.* 2020. V. 18. № 5. P. 446–455. doi: 10.2174/1570159X18666200131105418.
53. Wendeln A.C., Degenhardt K., Kaurani L., Gertig M., Ulas T., Jain G., Wagner J., Häslar L.M., Wild K., Skodras A., et al. // *Nature.* 2018. V. 556. № 7701. P. 332–338. doi: 10.1038/s41586-018-0023-4.
54. Mizuno T., Doi Y., Mizoguchi H., Jin S., Noda M., Sonobe Y., Takeuchi H., Suzumura A. // *Am. J. Pathol.* 2011. V. 179. № 4. P. 2016–2027. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.06.011.
55. Parkhurst C.N., Yang G., Ninan I., Savas J.N., Yates J.R., 3rd, Lafaille J.J., Hempstead B.L., Littman D.R., Gan W.B. // *Cell.* 2013. V. 155. № 7. P. 1596–1609. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.030.
56. Song M., Jin J., Lim J.E., Kou J., Pattanayak A., Rehman J.A., Kim H.D., Tahara K., Lalonde R., Fukuchi K. // *J. Neuroinflammation.* 2011. V. 8. P. 92. doi: 10.1186/1742-2094-8-92.
57. Hickman S.E., Allison E.K., Coleman U., Kingery-Gallagher

- N.D., El Khoury J. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 2780. doi: 10.3389/fimmu.2019.02780.
58. Block M.L., Zecca L., Hong J.S. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2007. V. 8. № 1. P. 57–69. doi: 10.1038/nrn2038.
59. Hickman S.E., Allison E.K., El Khoury J. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 33. P. 8354–8360. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008.
60. Wang Y., Cao Y., Yamada S., Thirunavukkarasu M., Nin V., Joshi M., Rishi M.T., Bhattacharya S., Camacho-Pereira J., Sharma A.K., et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2015. V. 35. № 6. P. 1401–1412. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305566.
61. Eyo U.B., Mo M., Yi M.H., Murugan M., Liu J., Yarlagadda R., Margolis D.J., Xu P., Wu L.J. // *Cell Rep.* 2018. V. 23. № 4. P. 959–966. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.001.
62. Hashioka S., Klegeris A., McGeer P.L. // *Neuropharmacology.* 2012. V. 63. № 4. P. 685–691. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.05.033.
63. Bezzi P., Domercq M., Brambilla L., Galli R., Schols D., De Clercq E., Vescovi A., Bagetta G., Kollias G., Meldolesi J., et al. // *Nat. Neurosci.* 2001. V. 4. № 7. P. 702–710. doi: 10.1038/89490.
64. Liu C.C., Zhao N., Fu Y., Wang N., Linares C., Tsai C.W., Bu G. // *Neuron.* 2017. V. 96. № 5. P. 1024–1032 e1023. doi: 10.1016/j.neuron.2017.11.013.
65. Ransohoff R.M. // *Nat. Neurosci.* 2016. V. 19. № 8. P. 987–991. doi: 10.1038/nn.4338.
66. El Hajj H., Savage J.C., Bisht K., Parent M., Vallieres L., Rivest S., Tremblay M.-E. // *J. Neuroinflammation.* 2019. V. 16. № 1. P. 87. doi: 10.1186/s12974-019-1473-9.
67. Sala Frigerio C., Wolfs L., Fattorelli N., Thrupp N., Voytyuk I., Schmidt I., et al. // *Cell Rep.* 2019. V. 27. № 4. P. 1293–1306 e1296. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.099.
68. Hashemiaghdam A., Mroczek M. // *J. Neuroimmunol.* 2020. V. 341. P. 577185. doi: 10.1016/j.jneuroim.2020.577185.
69. Holtman I.R., Skola D., Glass C.K. // *J. Clin. Invest.* 2017. V. 127. № 9. P. 3220–3229. doi: 10.1172/JCI90604.
70. Keren-Shaul H., Spinrad A., Weiner A., Matcovitch-Natan O., Dvir-Szternfeld R., Ulland T.K., David E., Baruch K., Lara-Astais D., Toth B., et al. // *Cell.* 2017. V. 169. № 7. P. 1276–1290 e1217. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.018.
71. Jay T.R., Hirsch A.M., Broihier M.L., Miller C.M., Neilson L.E., Ransohoff R.M., Lamb B.T., Landreth G.E. // *J. Neurosci.* 2017. V. 37. № 3. P. 637–647. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2110-16.2016.
72. Suarez-Calvet M., Araque Caballero M.A., Kleinberger G., Bateman R.J., Fagan A.M., Morris J.C., Levin J., Danek A., Ewers M., Haass C. // *Sci. Transl. Med.* 2016. V. 8. № 369. P. 369ra178. doi: 10.1126/scitranslmed.aag1767.
73. Claes C., Van Den Daele J., Boon R., Schouteden S., Colombo A., Monasor L.S., Fiers M., Ordovás L., Nami F., Bohrmann B., et al. // *Alzheimers Dement.* 2019. V. 15. № 3. P. 453–464. doi: 10.1016/j.jalz.2018.09.006.
74. Colonna M., Wang Y. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2016. V. 17. № 4. P. 201–207. doi: 10.1038/nrn.2016.7.
75. Mazaheri F., Snaidero N., Kleinberger G., Madore C., Daria A., Werner G., Krasemann S., Capell A., Trümbach D., Wurst W., et al. // *EMBO Rep.* 2017. V. 18. № 7. P. 1186–1198. doi: 10.15252/embr.201743922.
76. Browne T.C., McQuillan K., McManus R.M., O'Reilly J.A., Mills K.H., Lynch M.A. // *J. Immunol.* 2013. V. 190. № 5. P. 2241–2251. doi: 10.4049/jimmunol.1200947.
77. Fisher Y., Nemirovsky A., Baron R., Monsonego A. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 5. P. e10830. doi: 10.1371/journal.pone.0010830.
78. Goldeck D., Larbi A., Pellicano M., Alam I., Zerr I., Schmidt C., Fulop T., Pawelec G. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 6. P. e66664. doi: 10.1371/journal.pone.0066664.
79. Atarashi K., Tanoue T., Oshima K., Suda W., Nagano Y., Nishikawa H., Fukuda S., Saito T., Narushima S., Hase K., et al. // *Nature.* 2013. V. 500. № 7461. P. 232–236. doi: 10.1038/nature12331.
80. Hsiao E.Y., McBride S.W., Hsien S., Sharon G., Hyde E.R., McCue T., Codelli J.A., Chow J., Reisman S.E., Petrosino J.F., et al. // *Cell.* 2013. V. 155. № 7. P. 1451–1463. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.024.
81. Mayer E.A., Tillisch K., Gupta A. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 3. P. 926–938. doi: 10.1172/JCI76304.
82. Brkic M., Balusu S., Libert C., Vandembroucke R.E. // *Mediators Inflamm.* 2015. V. 2015. P. 620581. doi: 10.1155/2015/620581.
83. Vafadari B., Salamian A., Kaczmarek L. // *J. Neurochem.* 2016. V. 139 Suppl 2. P. 91–114. doi: 10.1111/jnc.13415.
84. Woo M.S., Park J.S., Choi I.Y., Kim W.K., Kim H.S. // *J. Neurochem.* 2008. V. 106. № 2. P. 770–780. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05430.x.
85. McGeer P.L., Itagaki S., Boyes B.E., McGeer E.G. // *Neurology.* 1988. V. 38. № 8. P. 1285–1291. doi: 10.1212/wnl.38.8.1285.
86. Yamada T., McGeer E.G., Schelper R.L., Wszolek Z.K., McGeer P.L., Pfeiffer R.F. // *Neurol. Psychiatry Brain Res.* 1993. V. 2. P. 26–35.
87. O'Callaghan J.P., Miller D.B., Reinhard J.F., Jr. // *Brain Res.* 1990. V. 521. № 1–2. P. 73–80. doi: 10.1016/0006-8993(90)91526-m.
88. Qian L., Flood P.M., Hong J.S. // *J. Neural. Transm. (Vienna).* 2010. V. 117. № 8. P. 971–979. doi: 10.1007/s00702-010-0428-1.
89. Ishikawa A., Takahashi H. // *J. Neurol.* 1998. V. 245. № 11 Suppl 3. P. P4–9. doi: 10.1007/pl00007745.
90. Langston J.W., Forno L.S., Tetrad J., Reeves A.G., Kaplan J.A., Karluk D. // *Ann. Neurol.* 1999. V. 46. № 4. P. 598–605. doi: 10.1002/1531-8249(199910)46:4<598::aid-ana7>3.0.co;2-f.
91. Zecca L., Wilms H., Geick S., Claassen J.H., Brandenburg L.O., Holzknicht C., Panizza M.L., Zucca F.A., Deuschl G., Sievers J., et al. // *Acta Neuropathol.* 2008. V. 116. № 1. P. 47–55. doi: 10.1007/s00401-008-0361-7.
92. Lee H.J., Patel S., Lee S.J. // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. № 25. P. 6016–6024. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0692-05.2005.
93. Farina C., Aloisi F., Meinel E. // *Trends Immunol.* 2007. V. 28. № 3. P. 138–145. doi: 10.1016/j.it.2007.01.005.
94. Gao H.M., Zhang F., Zhou H., Kam W., Wilson B., Hong J.S. // *Environ. Hlth Perspect.* 2011. V. 119. № 6. P. 807–814. doi: 10.1289/ehp.1003013.
95. Kim Y.S., Kim S.S., Cho J.J., Choi D.H., Hwang O., Shin D.H., Chun H., Beal F., Joh T. // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. № 14. P. 3701–3711. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4346-04.2005.
96. Choi D.H., Kim E.M., Son H.J., Joh T.H., Kim Y.S., Kim D., Beal M.F., Hwang O. // *J. Neurochem.* 2008. V. 106. № 1. P. 405–415. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05399.x.
97. Kim S.T., Kim E.M., Choi J.H., Son H.J., Ji I.J., Joh T.H., Chung S.J., Hwang O. // *Neurochem. Int.* 2010. V. 56. № 1. P. 161–167. doi: 10.1016/j.neuint.2009.09.014.
98. Kim E.M., Hwang O. // *J. Neurochem.* 2011. V. 116. № 1. P. 22–32. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07082.x.
99. Kim Y.S., Choi D.H., Block M.L., Lorenzl S., Yang L., Kim Y.J., Sugama S., Cho B., Hwang O., Browne S., et al. // *FASEB J.* 2007. V. 21. № 1. P. 179–187. doi: 10.1096/fj.06-5865com.
100. Lee E.J., Woo M.S., Moon P.G., Baek M.C., Choi I.Y., Kim W.K., Junn E., Kim H.-S. // *J. Immunol.* 2010. V. 185. № 1. P. 615–623. doi: 10.4049/jimmunol.0903480.
101. Vu T.K., Hung D.T., Wheaton V.I., Coughlin S.R. // *Cell.* 1991. V. 64. № 6. P. 1057–1068. doi: 10.1016/0092-8674(91)90261-v.
102. Suo Z., Wu M., Ameenuddin S., Anderson H.E., Zoloty J.E., Citron B.A., Andrade-Gordon P., Festoff B.W. // *J.*

- Neurochem. 2002. V. 80. № 4. P. 655–666. doi: 10.1046/j.0022-3042.2001.00745.x.
103. Schonbeck U, Mach F, Libby P. // *J. Immunol.* 1998. V. 161. № 7. P. 3340–3346.
104. Jian Liu K., Rosenberg G.A. // *Free Radic. Biol. Med.* 2005. V. 39. № 1. P. 71–80. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.033.
105. Aliev G., Palacios H.H., Walrafen B., Lipsitt A.E., Obrenovich M.E., Morales L. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2009. V. 41. № 10. P. 1989–2004. doi: 10.1016/j.biocel.2009.03.015.
106. Hauptmann S., Scherping I., Drose S., Brandt U., Schulz K.L., Jendrach M., Leuner K., Eckert A., Müller W.E. // *Neurobiol. Aging.* 2009. V. 30. № 10. P. 1574–1586. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.12.005.
107. Rhein V., Song X., Wiesner A., Ittner L.M., Baysang G., Meier F., Ozmen L., Bluethmann H., Dröse S., Brandt U., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 47. P. 20057–20062. doi: 10.1073/pnas.0905529106.
108. Devi L., Prabhu B.M., Galati D.F., Avadhani N.G., Anandatheerthavarada H.K. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 35. P. 9057–9068. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1469-06.2006.
109. Eckert A., Schmitt K., Gotz J. // *Alzheimers Res. Ther.* 2011. V. 3. № 2. P. 15. doi: 10.1186/alzrt74.
110. Wang Y., Xu E., Musich P.R., Lin F. // *CNS Neurosci. Ther.* 2019. V. 25. № 7. P. 816–824. doi: 10.1111/cns.13116.
111. Yao J., Irwin R.W., Zhao L., Nilsen J., Hamilton R.T., Brinton R.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 34. P. 14670–14675. doi: 10.1073/pnas.0903563106.
112. Valla J., Schneider L., Niedzielko T., Coon K.D., Caselli R., Sabbagh M.N., Ahern G.L., Baxter L., Alexander G., Walker D.G., et al. // *Mitochondrion.* 2006. V. 6. № 6. P. 323–330. doi: 10.1016/j.mito.2006.10.004.
113. Wang X., Su B., Siedlak S.L., Moreira P.I., Fujioka H., Wang Y., Casadesus G., Zhu X. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 49. P. 19318–19323. doi: 10.1073/pnas.0804871105.
114. Eckert A., Hauptmann S., Scherping I., Rhein V., Müller-Spahn F., Gotz J., Müller W.E. // *Neurodegener. Dis.* 2008. V. 5. № 3–4. P. 157–159. doi: 10.1159/000113689.
115. Li Z., Okamoto K., Hayashi Y., Sheng M. // *Cell.* 2004. V. 119. № 6. P. 873–887. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.003.
116. Keil U., Bonert A., Marques C.A., Scherping I., Weyermann J., Strosznajder J.B., Müller-Spahn F., Haass C., Czech C., Pradier L., et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 48. P. 50310–50320. doi: 10.1074/jbc.M405600200.
117. Cabezas-Opazo F.A., Vergara-Pulgar K., Perez M.J., Jara C., Osorio-Fuentealba C., Quintanilla R.A. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015. V. 2015. P. 509654. doi: 10.1155/2015/509654.
118. Cagalinec M., Safiulina D., Liiv M., Liiv J., Choubey V., Wareski P., Veksler V., Kaasik A. // *J. Cell. Sci.* 2013. V. 126. Pt 10. P. 2187–2197. doi: 10.1242/jcs.118844.
119. Chan D.C. // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2006. V. 22. P. 79–99. doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104638.
120. Twig G., Elorza A., Molina A.J., Mohamed H., Wikstrom J.D., Walzer G., Stiles L., Haigh S.E., Katz S., Las G., et al. // *EMBO J.* 2008. V. 27. № 2. P. 433–446. doi: 10.1038/sj.emboj.7601963.
121. Westrate L.M., Drocco J.A., Martin K.R., Hlavacek W.S., MacKeigan J.P. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 4. P. e95265. doi: 10.1371/journal.pone.0095265.
122. Figge M.T., Reichert A.S., Meyer-Hermann M., Osiewacz H.D. // *PLoS Comput. Biol.* 2012. V. 8. № 6. P. e1002576. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002576.
123. Chen H., Chan D.C. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № R2. P. R169–176. doi: 10.1093/hmg/ddp326.
124. Trimmer P.A., Borland M.K. // *Antioxid. Redox Signal.* 2005. V. 7. № 9–10. P. 1101–1109. doi: 10.1089/ars.2005.7.1101.
125. Hara Y., Yuk F., Puri R., Janssen W.G., Rapp P.R., Morrison J.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 1. P. 486–491. doi: 10.1073/pnas.1311310110.
126. Chen J.Q., Yager J.D., Russo J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1746. № 1. P. 1–17. doi: 10.1016/j.bbamer.2005.08.001.
127. Ghezzi D., Zeviani M. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. V. 748. P. 65–106. doi: 10.1007/978-1-4614-3573-0_4.
128. Finkel T., Holbrook N.J. // *Nature.* 2000. V. 408. № 6809. P. 239–247. doi: 10.1038/35041687.
129. Wei Y.H., Lu C.Y., Wei C.Y., Ma Y.S., Lee H.C. // *Chin. J. Physiol.* 2001. V. 44. № 1. P. 1–11.
130. Chance B., Sies H., Boveris A. // *Physiol. Rev.* 1979. V. 59. № 3. P. 527–605. doi: 10.1152/physrev.1979.59.3.527.
131. Alexeyev M.F. // *FEBS J.* 2009. V. 276. № 20. P. 5768–5787. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07269.x.
132. Castro Mdel R., Suarez E., Kraiselburd E., Isidro A., Paz J., Ferder L., Ayala-Torres S. // *Exp. Gerontol.* 2012. V. 47. № 1. P. 29–37. doi: 10.1016/j.exger.2011.10.002.
133. Voets A.M., Huigsloot M., Lindsey P.J., Leenders A.M., Koopman W.J., Willems P.H., Rodenburg R.J., Smeitink J.A., Smeets H.J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1822. № 7. P. 1161–1168. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.10.009.
134. Hollensworth S.B., Shen C., Sim J.E., Spitz D.R., Wilson G.L., LeDoux S.P. // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. V. 28. № 8. P. 1161–1174. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00214-8.
135. van Houten B., Woshner V., Santos J.H. // *DNA Repair (Amst.)* 2006. V. 5. № 2. P. 145–152. doi: 10.1016/j.dnarep.2005.03.002.
136. Guo C., Sun L., Chen X., Zhang D. // *Neural. Regen. Res.* 2013. V. 8. № 21. P. 2003–2014. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009.
137. Alearid A.M., Benard G., Augereau O., Malgat M., Talbot J.C., Mazat J.P., Letellier T., Dachary-Prigent J., Solaini G.C., Rossignol R. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2005. V. 37. № 4. P. 207–225. doi: 10.1007/s10863-005-6631-3.
138. Eckert E., von Clarmann T., Kiefer M., Stiller G.P., Lossow S., Glatthor N., Degenstein D.A., Froidevaux L., Godin-Beekmann S., Leblanc T., et al. // *Atmos Chem. Phys.* 2014. V. 14. № 5. P. 2571–2589. doi: 10.5194/acp-14-2571-2014.
139. Manczak M., Reddy P.H. // *Hum. Mol. Genet.* 2012. V. 21. № 11. P. 2538–2547. doi: 10.1093/hmg/dds072.
140. Schulz S.B., Klaft Z.J., Rosler A.R., Heinemann U., Gerevich Z. // *Neuropharmacol.* 2012. V. 62. № 2. P. 914–924. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.09.024.
141. Swerdlow R.H. // *J. Alzheimers Dis.* 2018. V. 62. № 3. P. 1403–1416. doi: 10.3233/JAD-170585.
142. Betarbet R., Sherer T.B., Greenamyre J.T. // *Bioessays.* 2002. V. 24. № 4. P. 308–318. doi: 10.1002/bies.10067.
143. Bender A., Krishnan K.J., Morris C.M., Taylor G.A., Reeve A.K., Perry R.H., Jaros E., Hersheson J.S., Betts J., Klopstock T., et al. // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. № 5. P. 515–517. doi: 10.1038/ng1769.
144. Muftuoglu M., Elibol B., Dalmizrak O., Ercan A., Kulaksiz G., Ogun H., Dalkara T. // *Mov. Disord.* 2004. V. 19. № 5. P. 544–548. doi: 10.1002/mds.10695.
145. Palacino J.J., Sagi D., Goldberg M.S., Krauss S., Motz C., Wacker M., Klose J., Shen J. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 18. P. 18614–18622. doi: 10.1074/jbc.M401135200.
146. Gandhi S., Wood-Kaczmar A., Yao Z., Plun-Favreau H., Deas E., Klupsch K., Downward J., Latchman D.S., Tabrizi S.J., Wood N.W., et al. // *Mol. Cell.* 2009. V. 33. № 5. P. 627–638. doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.013.
147. Irrcher I., Aleyasin H., Seifert E.L., Hewitt S.J., Chhabra S., Phillips M., Lutz A.K., Rousseaux M.W.C., Bevilacqua L., Jahani-Asl A., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 19.

- P. 3734–3746. doi: 10.1093/hmg/ddq288.
148. Choi J, Sullards M.C., Olzmann J.A., Rees H.D., Weintraub S.T., Bostwick D.E., Gearing M., Levey A.I., Chin L.S., Li L. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 16. P. 10816–10824. doi: 10.1074/jbc.M509079200.
149. Devi L., Raghavendran V., Prabhu B.M., Avadhani N.G., Anandatheerthavarada H.K. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 14. P. 9089–9100. doi: 10.1074/jbc.M710012200.
150. Martin L.J., Pan Y., Price A.C., Sterling W., Copeland N.G., Jenkins N.A., Price D.L., Lee M.K. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 1. P. 41–50. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4308-05.2006.
151. Subramaniam S.R., Chesselet M.F. // *Prog. Neurobiol.* 2013. V. 106–107. P. 17–32. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.004.
152. Ammal Kaidery N., Thomas B. // *Neurochem. Int.* 2018. V. 117. P. 91–113. doi: 10.1016/j.neuint.2018.03.001.
153. Puopolo M., Raviola E., Bean B.P. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 3. P. 645–656. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4341-06.2007.
154. Mosharov E.V., Larsen K.E., Kanter E., Phillips K.A., Wilson K., Schmitz Y., Krantz D.E., Kobayashi K., Edwards R.H., Sulzer D. // *Neuron.* 2009. V. 62. P. 218–229.
155. Surmeier D.J., Guzman J.N., Sanchez-Padilla J., Schumacker P.T. // *Neuroscience.* 2011. V. 198. P. 221–231. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.08.045.
156. Chan C.S., Guzman J.N., Ilijic E., Mercer J.N., Rick C., Tkatch T., Meredith G.E., Surmeier D.J. // *Nature.* 2007. V. 447. № 7148. P. 1081–1086. doi: 10.1038/nature05865.
157. Bezprozvanny I. // *Trends Mol. Med.* 2009. V. 15. № 3. P. 89–100. doi: 10.1016/j.molmed.2009.01.001.
158. Shevtsova E.F., Vinogradova D.V., Neganova M.E., Shevtsov P.N., Lednev B.V., Bachurin S.O. // *Biomed. Chem. Res. Meth.* 2018. V. 1. № 3. P. e00058. doi: 10.18097/BMCRM00058.
159. Peng T.I., Jou M.J. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010. V. 1201. P. 183–188. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05634.x.
160. Lopez J.R., Lyckman A., Oddo S., Laferla F.M., Querfurth H.W., Shtifman A. // *J. Neurochem.* 2008. V. 105. № 1. P. 262–271. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05135.x.
161. Bossy-Wetzel E., Petrilli A., Knott A.B. // *Trends Neurosci.* 2008. V. 31. № 12. P. 609–616. doi: 10.1016/j.tins.2008.09.004.
162. Panov A.V., Gutekunst C.A., Leavitt B.R., Hayden M.R., Burke J.R., Strittmatter W.J., Greenamyre J.T. // *Nat. Neurosci.* 2002. V. 5. № 8. P. 731–736. doi: 10.1038/nn884.
163. Tang T.S., Slow E., Lupu V., Stavrovskaya I.G., Sugimori M., Llinas R., Kristal B.S., Hayden M.R., Bezprozvanny I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 7. P. 2602–2607. doi: 10.1073/pnas.0409402102.
164. Zhang H., Li Q., Graham R.K., Slow E., Hayden M.R., Bezprozvanny I. // *Neurobiol. Dis.* 2008. V. 31. № 1. P. 80–88. doi: 10.1016/j.nbd.2008.03.010.
165. Wang X., Zhu S., Pei Z., Drozdova M., Stavrovskaya I.G., Del Signore S.J., Cormier K., Shimony E.M., Wang H., Ferrante R.J., et al. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 38. P. 9473–9485. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1867-08.2008.
166. Безпрозванный И.Б. // *Acta Naturae.* 2010. T. 1. № 4. P. 80–88.
167. Bachurin S.O., Shevtsova E.P., Kireeva E.G., Oxenkrug G.F., Sablin S.O. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003. V. 993. P. 334–344; discussion 345–339. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07541.x.
168. Neganova M.E., Klochkov S.G., Afanasieva S.V., Chudinova E.S., Serkova T.P., Shevtsova E.F. // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2014. V. 24. P. 262.
169. Neganova M.E., Klochkov S.G., Petrova L.N., Shevtsova E.F., Afanasieva S.V., Chudinova E.S., Fisenko V.P., Bachurin S.O., Barreto G.E., Aliev G. // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2017. V. 16. № 3. P. 351–355.
170. Hardy J. // *Neuron.* 2006. V. 52. № 1. P. 3–13. doi: 10.1016/j.neuron.2006.09.016.
171. Li X., Bao X., Wang R. // *Mol. Med. Rep.* 2016. V. 14. № 2. P. 1043–1053. doi: 10.3892/mmr.2016.5390.
172. Cheung P., Allis C.D., Sassone-Corsi P. // *Cell.* 2000. V. 103. № 2. P. 263–271. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00118-5.
173. Dejligbjerg M., Grauslund M., Litman T., Collins L., Qian X., Jeffers M., Lichenstein H., Jensen P.B., Sehested M. // *Mol. Cancer.* 2008. V. 7. P. 70. doi: 10.1186/1476-4598-7-70.
174. Hrabeta J., Stiborova M., Adam V., Kizek R., Eckschlager T. // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2014. V. 158. № 2. P. 161–169. doi: 10.5507/bp.2013.085.
175. Chen F., Du Y., Esposito E., Liu Y., Guo S., Wang X., Lo E.H., Changhong Xing C., Ji X. // *Transl. Stroke Res.* 2015. V. 6. № 6. P. 478–484. doi: 10.1007/s12975-015-0429-3.
176. Ziemka-Nalecz M., Zalewska T. // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.).* 2014. V. 74. № 4. P. 383–395.
177. Гомазков О.А. // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2015. T. 78. № 11. С. 35–44.
178. Zhang K., Schrag M., Crofton A., Trivedi R., Vinters H., Kirsch W. // *Proteomics.* 2012. V. 12. № 8. P. 1261–1268. doi: 10.1002/pmic.201200010.
179. Ziemka-Nalecz M., Jaworska J., Sypecka J., Zalewska T. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2018. V. 77. № 10. P. 855–870. doi: 10.1093/jnen/nly073.
180. Vaiserman A.M., Pasyukova E.G. // *Front. Genet.* 2012. V. 3. P. 224. doi: 10.3389/fgene.2012.00224.
181. Hahnen E., Hauke J., Trankle C., Eyupoglu I.Y., Wirth B., Blumcke I. // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2008. V. 17. № 2. P. 169–184. doi: 10.1517/13543784.17.2.169.
182. Qing H., He G., Ly P.T., Fox C.J., Staufenbiel M., Cai F., Zhang Z., Wei S., Sun X., Chen C.-H., et al. // *J. Exp. Med.* 2008. V. 205. № 12. P. 2781–2789. doi: 10.1084/jem.20081588.
183. Ricobaraza A., Cuadrado-Tejedor M., Marco S., Perez-Otano I., Garcia-Osta A. // *Hippocampus.* 2012. V. 22. № 5. P. 1040–1050. doi: 10.1002/hipo.20883.
184. Huang J., Chen Y.J., Bian W.H., Yu J., Zhao Y.W., Liu X.Y. // *Chin. Med. J. (Engl.).* 2010. V. 123. № 10. P. 1311–1314.
185. Zhang Z., Qin X., Tong N., Zhao X., Gong Y., Shi Y., Wu X. // *Exp. Eye Res.* 2012. V. 94. № 1. P. 98–108. doi: 10.1016/j.exer.2011.11.013.
186. Zhang Z.Y., Schluesener H.J. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2013. V. 72. № 3. P. 178–185. doi: 10.1097/NEN.0b013e318283114a.
187. Benito E., Urbanke H., Ramachandran B., Barth J., Halder R., Awasthi A., Jain G., Capece V., Burkhardt S., Navarro-Sala M., et al. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 9. P. 3572–3584. doi: 10.1172/JCI79942.
188. Guan J.S., Haggarty S.J., Giacometti E., Dannenberg J.H., Joseph N., Gao J., Nieland T.J.F., Zhou Y., Wang X., Mazitschek R., et al. // *Nature.* 2009. V. 459. № 7243. P. 55–60. doi: 10.1038/nature07925.
189. Akhtar M.W., Raingo J., Nelson E.D., Montgomery R.L., Olson E.N., Kavalali E.T., Monteggia L.M. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 25. P. 8288–8297. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0097-09.2009.
190. McQuown S.C., Barrett R.M., Matheos D.P., Post R.J., Rogge G.A., Alenghat T., Mullican S.E., Jones S., Rusche J.R., Lazar M.A., et al. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 2. P. 764–774. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5052-10.2011.
191. Bardai F.H., D’Mello S.R. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 5. P. 1746–1751. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5704-10.2011.
192. Bali P., Pranpat M., Bradner J., Balasis M., Fiskus W., Guo F., Rocha K., Kumaraswamy S., Boyapalle S., Atadja P., et al. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 29. P. 26729–26734. doi: 10.1074/jbc.C500186200.
193. Zhao Z., Xu H., Gong W. // *Protein Pept. Lett.* 2010. V. 17.

- № 5. P. 555–558. doi: 10.2174/092986610791112620.
194. Ding H., Dolan P.J., Johnson G.V. // *J. Neurochem.* 2008. V. 106. № 5. P. 2119–2130. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05564.x.
195. Chen S., Owens G.C., Makarenkova H., Edelman D.B. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 5. P. e10848. doi: 10.1371/journal.pone.0010848.
196. Rivieccio M.A., Brochier C., Willis D.E., Walker B.A., D'Annibale M.A., McLaughlin K., Siddiq A., Kozikowski A.P., Jaffrey S.R., Twiss J.L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 46. P. 19599–19604. doi: 10.1073/pnas.0907935106.
197. Bolger T.A., Yao T.P. // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. № 41. P. 9544–9553. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1826-05.2005.
198. Gao J., Wang W.Y., Mao Y.W., Graff J., Guan J.S., Pan L., Pan L., Mak G., Kim D., Su S.C., et al. // *Nature.* 2010. V. 466. № 7310. P. 1105–1109. doi: 10.1038/nature09271.
199. Julien C., Tremblay C., Emond V., Lebbadi M., Salem N., Jr., Bennett D.A., Calon F. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2009. V. 68. № 1. P. 48–58. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181922348.
200. Andres K., Fahrenholz F. // *FEBS J.* 2010. V. 277. № 7. P. 1585–1596. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07566.x.
201. Kawamura Y., Uchijima Y., Horike N., Tonami K., Nishiyama K., Amano T., Asano T., Kurihara Y., Kurihara H. // *J. Clin. Invest.* 2010. V. 120. № 8. P. 2817–2828. doi: 10.1172/JCI42020.
202. Kim S.H., Lu H.F., Alano C.C. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 3. P. e14731. doi: 10.1371/journal.pone.0014731.
203. Yang S.S., Zhang R., Wang G., Zhang Y.F. // *Transl. Neurodegener.* 2017. V. 6. P. 19. doi: 10.1186/s40035-017-0089-1.
204. Sweeney P., Park H., Baumann M., Dunlop J., Frydman J., Kopito R., McCampbell A., Leblanc G., Venkateswaran A., Nurmi A., et al. // *Transl. Neurodegener.* 2017. V. 6. P. 6. doi: 10.1186/s40035-017-0077-5.
205. Weydt P., La Spada A.R. // *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2006. V. 10. № 4. P. 505–513. doi: 10.1517/14728222.10.4.505.
206. Gandhi J., Antonelli A.C., Afridi A., Vatsia S., Joshi G., Romanov V., Murray I.V.J., Khan S.A. // *Rev. Neurosci.* 2019. V. 30. № 4. P. 339–358. doi: 10.1515/revneuro-2016-0035.
207. Chung C.G., Lee H., Lee S.B. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2018. V. 75. № 17. P. 3159–3180. doi: 10.1007/s00018-018-2854-4.
208. Ross C.A., Poirier M.A. // *Nat. Med.* 2004. V. 10 Suppl. P. S10–17. doi: 10.1038/nm1066.
209. Kaplan B., Ratner V., Haas E. // *J. Mol. Neurosci.* 2003. V. 20. № 2. P. 83–92. doi: 10.1385/JMN:20:2:83.
210. Lavedan C. // *Genome Res.* 1998. V. 8. № 9. P. 871–880. doi: 10.1101/gr.8.9.871.
211. Тарасова Т.В., Лыткина О.А., Роман А.Ю., Бачурин С.О., Устюгов А.А. // *ДАН.* 2016. Т. 466. № 5. С. 620–623. doi: 10.7868/S0869565216050285.
212. Kim W.S., Kagedal K., Halliday G.M. // *Alzheimers Res. Ther.* 2014. V. 6. № 5. P. 73. doi: 10.1186/s13195-014-0073-2.
213. Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. // *Nature.* 1997. V. 388. № 6645. P. 839–840. doi: 10.1038/42166.
214. Mahul-Mellier A.L., Bartscher J., Maharjan N., Weerens L., Croisier M., Kuttler F., Leleu M., Knott G.W., Lashuel H.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 9. P. 4971–4982. doi: 10.1073/pnas.1913904117.
215. Кохан В., Ванькин Г., Нинкина Н., Бачурин С., Шамакина И. // *Вопр. наркологии.* 2012. № 1. P. 70–83.
216. Galasko D. // *Neurol. Clin.* 2017. V. 35. № 2. P. 325–338. doi: 10.1016/j.ncl.2017.01.004.
217. Kosaka K. // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2014. V. 90. № 8. P. 301–306. doi: 10.2183/pjab.90.301.
218. Sanford A.M. // *Clin. Geriatr. Med.* 2018. V. 34. № 4. P. 603–615. doi: 10.1016/j.cger.2018.06.007.
219. Chartier-Harlin M.C., Crawford F., Houlden H., Warren A., Hughes D., Fidani L., Goate A., Rossor M., Roques P., Hardy J., et al. // *Nature.* 1991. V. 353. № 6347. P. 844–846. doi: 10.1038/353844a0.
220. Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., et al. // *Nature.* 1991. V. 349. № 6311. P. 704–706. doi: 10.1038/349704a0.
221. Haass C., Selkoe D.J. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 8. № 2. P. 101–112. doi: 10.1038/nrm2101.
222. Dinamarca M.C., Rios J.A., Inestrosa N.C. // *Front. Physiol.* 2012. V. 3. P. 464. doi: 10.3389/fphys.2012.00464.
223. Lashuel H.A., Hartley D., Petre B.M., Walz T., Lansbury P.T., Jr. // *Nature.* 2002. V. 418. № 6895. P. 291. doi: 10.1038/418291a.
224. Lin H., Bhatia R., Lal R. // *FASEB J.* 2001. V. 15. № 13. P. 2433–2444. doi: 10.1096/fj.01-0377com.
225. Shankar G.M., Bloodgood B.L., Townsend M., Walsh D.M., Selkoe D.J., Sabatini B.L. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 11. P. 2866–2875. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4970-06.2007.
226. Shankar G.M., Li S., Mehta T.H., Garcia-Munoz A., Shepardson N.E., Smith I., Brett F.M., Farrell M.A., Rowan M.J., Lemere C.A., et al. // *Nat. Med.* 2008. V. 14. № 8. P. 837–842. doi: 10.1038/nm1782.
227. Li S., Hong S., Shepardson N.E., Walsh D.M., Shankar G.M., Selkoe D. // *Neuron.* 2009. V. 62. № 6. P. 788–801. doi: 10.1016/j.neuron.2009.05.012.
228. Bourdenx M., Koulakiotis N.S., Sanoudou D., Bezaud E., Dehay B., Tsarobopoulos A. // *Prog. Neurobiol.* 2017. V. 155. P. 171–193. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.07.003.
229. Gomes G.M., Dalmolin G.D., Bar J., Karpova A., Mello C.F., Kreutz M.R., Rubin M.A. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 6. P. e99184. doi: 10.1371/journal.pone.0099184.
230. Talantova M., Sanz-Blasco S., Zhang X., Xia P., Akhtar M.W., Okamoto S., Dziewczapolski G., Nakamura T., Cao G., Pratt A.E., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 27. P. E2518–2527. doi: 10.1073/pnas.1306832110.
231. Roberson E.D., Scearce-Levie K., Palop J.J., Yan F., Cheng I.H., Wu T., Gerstein H., Yu G.Q., Mucke L. // *Science.* 2007. V. 316. № 5825. P. 750–754. doi: 10.1126/science.1141736.
232. Frost B., Gotz J., Feany M.B. // *Trends Cell Biol.* 2015. V. 25. № 1. P. 46–53. doi: 10.1016/j.tcb.2014.07.005.
233. Santacruz K., Lewis J., Spire T., Paulson J., Kotilinek L., Ingelsson M., Guimaraes A., DeTure M., Ramsden M., McGowan E., et al. // *Science.* 2005. V. 309. № 5733. P. 476–481. doi: 10.1126/science.1113694.
234. Zilka N., Kontsekova E., Novak M. // *J. Alzheimers Dis.* 2008. V. 15. № 2. P. 169–179. doi: 10.3233/jad-2008-15203.
235. Kovacech B., Skrabana R., Novak M. // *Neurodegener. Dis.* 2010. V. 7. № 1–3. P. 24–27. doi: 10.1159/000283478.
236. Novak M., Kabat J., Wischik C.M. // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 1. P. 365–370.
237. Wischik C.M., Novak M., Thogersen H.C., Edwards P.C., Runswick M.J., Jakes R., Walker J.E., Milstein C., Roth M., Klug A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. № 12. P. 4506–4510. doi: 10.1073/pnas.85.12.4506.
238. Wischik C.M., Novak M., Edwards P.C., Klug A., Tichelaar W., Crowther R.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. № 13. P. 4884–4888. doi: 10.1073/pnas.85.13.4884.
239. Dickey C.A., Petrucelli L. // *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2006. V. 10. № 5. P. 665–676. doi: 10.1517/14728222.10.5.665.
240. Pickhardt M., von Bergen M., Gazova Z., Hascher A., Biernat J., Mandelkow E.-M., Mandelkow E. // *Curr. Alzheimer Res.* 2005. V. 2. № 2. P. 219–226. doi: 10.2174/1567205053585891.
241. Necula M., Chirita C.N., Kuret J. // *Biochemistry.* 2005.

- V. 44. № 30. P. 10227–10237. doi: 10.1021/bi050387o.
242. Wischik C.M., Edwards P.C., Lai R.Y., Roth M., Harrington C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. № 20. P. 11213–11218. doi: 10.1073/pnas.93.20.11213.
243. Iqbal K., Grundke-Iqbal I. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2007. V. 64. № 17. P. 2234–2244. doi: 10.1007/s00018-007-7221-9.
244. Iqbal K., Grundke-Iqbal I. // *Curr. Drug. Targets.* 2004. V. 5. № 6. P. 495–502. doi: 10.2174/1389450043345254.
245. Zhang B., Maiti A., Shively S., Lakhani F., McDonald-Jones G., Bruce J., Lee E.B., Xie S.X., Joyce S., Li C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 1. P. 227–231. doi: 10.1073/pnas.0406361102.
246. Dickey C.A., Ash P., Klosak N., Lee W.C., Petrucelli L., Hutton M., Eckman C.B. // *Mol. Neurodegener.* 2006. V. 1. P. 6. doi: 10.1186/1750-1326-1-6.
247. Dickey C.A., Eriksen J., Kamal A., Burrows F., Kasibhatla S., Eckman C.B., Hutton M., Petrucelli L. // *Curr. Alzheimer Res.* 2005. V. 2. № 2. P. 231–238. doi: 10.2174/1567205053585927.
248. Tabira T. // *Tohoku J. Exp. Med.* 2010. V. 220. № 2. P. 95–106. doi: 10.1620/tjem.220.95.
249. Schneider A., Mandelkow E. // *Neurotherapeutics.* 2008. V. 5. № 3. P. 443–457. doi: 10.1016/j.nurt.2008.05.006.
250. Taniguchi T., Sumida M., Hiraoka S., Tomoo K., Kakehi T., Minoura K., Sugiyama S., Inaka K., Ishida T., Saito N., et al. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. № 6. P. 1399–1404. doi: 10.1016/j.febslet.2005.01.039.
251. Sigurdsson E.M., Scholtzova H., Mehta P.D., Frangione B., Wisniewski T. // *Am. J. Pathol.* 2001. V. 159. № 2. P. 439–447. doi: 10.1016/s0002-9440(10)61715-4.
252. Janus C., Pearson J., McLaurin J., Mathews P.M., Jiang Y., Schmidt S.D., Chishti M.A., Horne P., Heslin D., French J., et al. // *Nature.* 2000. V. 408. № 6815. P. 979–982. doi: 10.1038/35050110.
253. Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., et al. // *Nature.* 1999. V. 400. № 6740. P. 173–177. doi: 10.1038/22124.
254. Boutajangout A., Quartermain D., Sigurdsson E.M. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 49. P. 16559–16566. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4363-10.2010.
255. Asuni A.A., Boutajangout A., Quartermain D., Sigurdsson E.M. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 34. P. 9115–9129. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007.
256. Blokhuis A.M., Groen E.J., Koppers M., van den Berg L.H., Pasterkamp R.J. // *Acta Neuropathol.* 2013. V. 125. № 6. P. 777–794. doi: 10.1007/s00401-013-1125-6.
257. Prasad A., Bharathi V., Sivalingam V., Girdhar A., Patel B.K. // *Front. Mol. Neurosci.* 2019. V. 12. P. 25. doi: 10.3389/fnmol.2019.00025.
258. Arrasate M., Finkbeiner S. // *Exp. Neurol.* 2012. V. 238. № 1. P. 1–11. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.12.013.
259. Finkbeiner S. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011. V. 3. № 6. P. a007476. doi: 10.1101/cshperspect.a007476.

УДК 577.25

Молекулярные основы хеморецепции насекомых

Е. Л. Соколинская, Д. В. Колесов, К. А. Лукьянов, А. М. Богданов*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*E-mail: noobissat@ya.ru

Поступила в редакцию 28.09.2019

Принята к печати 03.06.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11038

РЕФЕРАТ Хеморецепция – способность воспринимать специфические химические стимулы – является одной из наиболее эволюционно древних форм взаимодействия живых организмов с окружающей средой. Хеморецепторные системы обнаружены у представителей всех царств, а у высших многоклеточных животных они, наравне с системами фото- и механорецепции, создают основу для функционирования пяти «традиционных» чувств. Насекомые выработали своеобразную и одну из наиболее сложно организованных систем хеморецепции, включающую не менее трех суперсемейств рецепторов, обеспечивающих восприятие запаха и вкуса, а также химическую коммуникацию этих животных. Исключительное разнообразие физиологически релевантных соединений в окружающей среде обусловило появление широкого репертуара хеморецепторов различной специфичности. Так, у насекомых они представлены несколькими структурно и функционально различающимися классами белков и кодируются сотнями генов. В настоящем обзоре мы даем краткую характеристику хеморецепторной системы насекомых, описывая основные группы рецепторов, ее формирующих, и останавливаясь на своеобразии архитектуры и механизмов функционирования этих молекул.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА хеморецептор, катионный канал, потенциал действия, ионотропный рецептор, метаболитный рецептор, одорант, обоняние, вкусовой рецептор, насекомые.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ OSN – обонятельные чувствительные нейроны (olfactory sensory neurons); OR – обонятельные рецепторы (odorant receptors); GPCR – G-белок-сопряженный рецептор; DAG – диацилглицерин (diacylglycerol); IP3 – инозитолтрифосфат (inositol trisphosphate); IR – ионотропные рецепторы (ionotropic receptors); ATD – N-концевой домен (amino-terminal domain); GRN – вкусовые рецепторные нейроны (gustatory receptor neurons); GR – вкусовые рецепторы (gustatory receptors).

ВВЕДЕНИЕ

Живые существа получают информацию об окружающем мире при помощи органов чувств: зрения, слуха, обоняния, вкуса. Восприятие факторов внешней среды в каждой сенсорной системе происходит благодаря небольшому участку ткани, чувствительному к определенному физическому стимулу (электромагнитному излучению в случае зрения, механическим колебаниям воздуха в случае слуха, химическим веществам в случае обоняния и вкуса). Такие специализированные участки ткани многоклеточных организмов называют *рецепторами*. Рецепторные клетки преобразуют улавливаемый свет, звук или химические вещества в нервный импульс, который поступает в мозг для обработки полученной информации. Процесс преобразования физического стимула в нервный импульс называют *трансдукцией* сигнала. В ходе этого процесса рецепторные клетки (нейроны либо другие специализированные

клетки) воспринимают сигнал при помощи особых рецепторных молекул. Это приводит к изменению активности ионных каналов в мембране нейронов, а следовательно, к изменению мембранного потенциала клетки (деполяризации или гиперполяризации клеточной мембраны). Деполяризация приводит к запуску потенциала действия и инициирует передачу нервного импульса в нервной системе.

Молекулы рецепторов могут либо непосредственно воздействовать на ионные каналы (в этом случае рецептор называют ионотропным), либо запускать примембранный сигнальный каскад, приводящий к активации ионных каналов через специализированные G-белки (в этом случае рецептор называют метаболитным). Ионотропный путь трансдукции сигнала обнаруживает свои преимущества при значительной интенсивности стимула, поскольку обеспечивает максимально быстрый электрический ответ нейрона. Метаболитная трансдукция, с другой стороны, не-

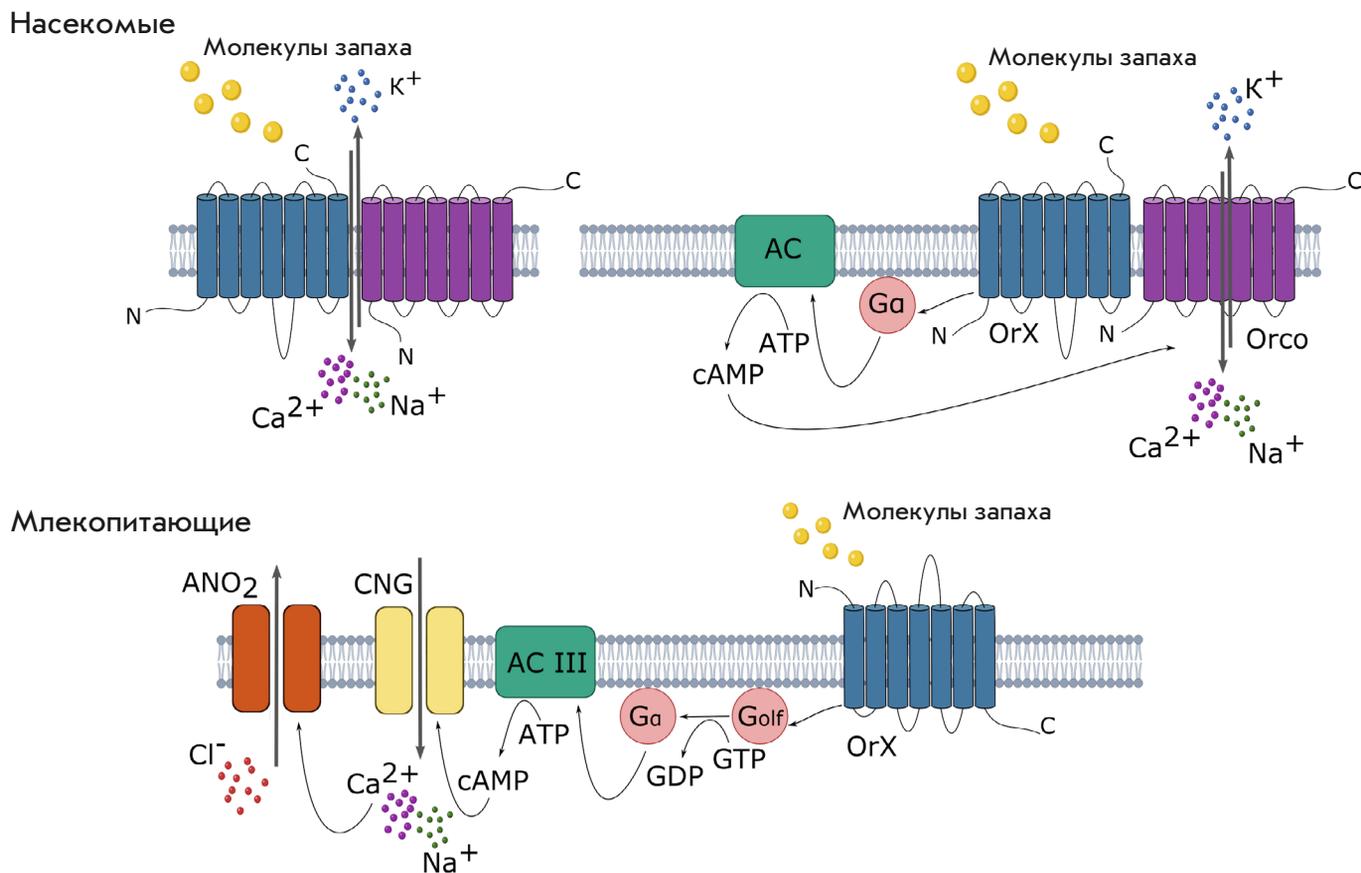


Рис. 1. Молекулярные механизмы трансдукции сигнала обонятельными рецепторами насекомых и млекопитающих. На верхней части схемы показаны основной (ионотропный) и дополнительный (метаботропный) пути функционирования обонятельных рецепторов насекомых. На нижней части схемы показан обонятельный рецептор млекопитающего и примембранный каскад, обеспечивающий трансдукцию его сигнала [2–4]. AC III – аденилатциклаза типа III; ANO2 – канал аноктамин-2; CNG – канал, связывающий циклические нуклеотиды; Gα – α-субъединица обонятельного G-белка; OrX – запах-специфичный рецепторный обонятельный белок Or; Orco – константный корецепторный обонятельный белок

заменима в случае слабых стимулов, восприятие которых требует амплификации сигнала рецепторных молекул. Органы чувств многоклеточных животных используют оба механизма, порой изящно комбинируя их.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ХЕМОРЕЦЕПЦИИ ЖИВОТНЫХ

Хеморецепция – важный элемент процесса восприятия и последующего анализа информации из окружающего мира. Химические стимулы помогают получить информацию о вкусовых качествах, безопасности и энергетической ценности пищи, предупреждают живые организмы о присутствии потенциальных хищников или о других опасностях, направляют социальные взаимодействия. Запахи, вкусы и другие химические стимулы распознаются разнообразным набором хемосенсорных систем у различных животных. Хемосенсорная трансдукция – процесс, в ходе которого химические стимулы (запахи,

вкусы, питательные вещества, раздражители и даже газы) распознаются и вызывают изменение свойств клеточной мембраны или высвобождение нейромедиаторов и гормонов [1]. Обычно эти процессы происходят в чувствительных нейронах, которые часто содержат специализированные субклеточные компартменты – реснички или микроворсинки – оптимизированные для процесса трансдукции. В большинстве случаев хемосенсорная трансдукция представляет собой многоэтапный процесс, в ходе которого биохимический сигнал на мембране преобразуется в электрический сигнал – потенциал действия. Химические сигналы (или стимулы) – это молекулы, производимые различными источниками: почвой, растениями, животными. Вырабатываемые молекулы могут быть летучими или растворенными. В первом случае химический сигнал воспринимается обонятельными рецепторами (olfactory receptors), во втором – вкусовыми (gustatory receptors). Среди сложных хемосенсорных

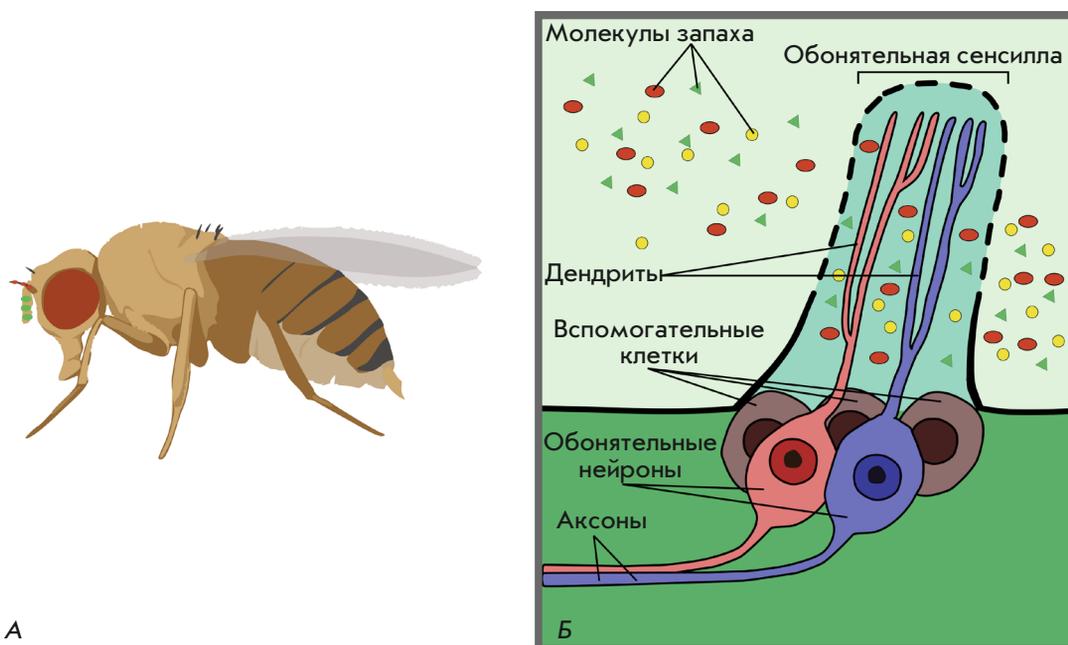


Рис. 2. Обонятельные органы *D. melanogaster*. А – основные места локализации обонятельных сенсилл на теле *Drosophila* (обозначены цветными точками). Б – путь молекул «запаха» (одоранта), попадающих на обонятельный рецептор из внешней среды. Молекулы достигают антенн мухи, снабженных многочисленными чувствительными волосками – сенсиллами. Поверхность каждой сенсиллы имеет поры, которые позволяют молекулам «запаха» проникать внутрь сенсиллы – туда, где расположены дендриты обонятельных чувствительных нейронов (OSN). На мембранах дендритов экспонированы обонятельные рецепторы, которые специфически связывают молекулы «запаха». Адаптировано из [1]

систем высших многоклеточных животных наиболее хорошо изучены на молекулярном уровне обонятельные и вкусовые анализаторы насекомых и млекопитающих. Интересно, что при восприятии химических стимулов млекопитающие полагаются в основном на метаболитные рецепторы, в то время как насекомые – на ионотропные [2] (рис. 1).

ХЕМОРЕЦЕПТОРЫ НАСЕКОМЫХ

Обонятельные рецепторы

У насекомых за восприятие запахов отвечают обонятельные чувствительные нейроны (olfactory sensory neurons – OSN), которые экспрессируют в своих дендритах обонятельные рецепторы. OSN локализуются в придатках лба, усиках (антеннах) и верхнечелюстных щупиках (рис. 2).

Обоняние насекомых обеспечивается рецепторами трех типов, представителями разных семейств трансмембранных белков. Первый тип представлен собственно обонятельными рецепторами (odorant receptors, OR), распознающими запахи пищи и феромоны. OR представляют собой гетеродимеры, состоящие из переменного запах-специфичного рецепторного белка Or и константного корцепторного белка Orco [5, 6] (рис. 3)

Подобно типичным представителям семейства G-белок-сопряженных рецепторов (GPCR), OR состоят из семи ассоциированных α -спиралей, однако отличаются от GPCR своей ориентацией в плазматической мембране: OR-белки насекомых имеют цитоплазматический N-конец и направленный во внеклеточную среду C-конец [7, 8]. Хотя элементарной функциональной единицей обонятельной системы насекомых служит гетеродимер OrX/Y-Orco, в мембранах обонятельных нейронов рецепторы, по всей видимости, функционируют в составе крупных супрамолекулярных ансамблей, состав и топология которых остаются плохо изученными. Результаты недавних исследований проливают свет на молекулярную организацию подобных комплексов. Так, получена криоэлектронная структура субъединицы Orco из *Apocrypta bakeri* [9]. Orco формирует тетрамеры, которые, если посмотреть перпендикулярно плоскости мембраны, напоминают по форме «вертушку» (рис. 4А). Тетрамер имеет приблизительно 100 Å в диаметре и 80 Å в осевом направлении. Центральная пора формируется четырьмя субъединицами. Каждая субъединица имеет семь спиральных сегментов, пронизывающих мембрану под углом $\sim 30^\circ$; при этом C-конец каждой субъединицы ориентирован наружу, а N-конец внутрь клетки (рис. 4Б). Помимо

семи основных спиралей (спирали 1–7) имеется дополнительная N-концевая спираль (спираль 0), которая в процессе упаковки помещается под петлей 4 по внешнему периметру канала. Спираль 7 расположена ближе всего к центральной оси и состоит из двух частей – цитоплазматического сегмента (7a) и трансмембранного сегмента (7b), разделенных β -шпилькой из 15 аминокислотных остатков. Спираль 7b формирует центральную пору, а 7a образует корякорного домена. Спирали 4, 5 и 6 простираются далеко за пределы клеточной мембраны (на 40 Å в цитозоль), где они окружают 7a, завершая формирование якорного домена. Трансмембранный домен каждой субъединицы стабилизируется заряженными и полярными аминокислотами спиралей 2, 4, 5 и 6, образуя плотную сеть гидрофильных взаимодействий в пределах внутриклеточного монослоя мембраны. В пределах внеклеточного монослоя спирали 1–6 расщепляются, образуя расщелину глубиной 10 Å и длиной около 20 Å. Предполагается, что подобный карман может служить сайтом связывания низкомолекулярных лигандов. Мутации, изменяющие специфичность OR к одорантам, также картируются в пределах этого кармана, указывая на потенциальное существование общего структурного локуса для связывания лиганда в Orco и Or. В структуре Orco упорядоченный участок внеклеточных петель 3–4 ограничивает доступ к карману, что может препятствовать связыванию одоранта, сохраняя тем самым специфичность к запахам в комплексах Or–Orco.

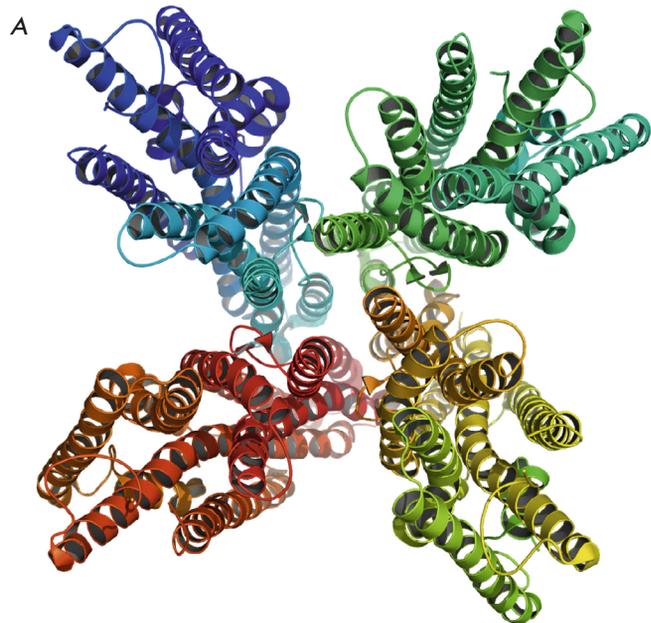


Рис. 4. Структура Orco из *Aprostocyta bakeri*. А – структура гомотетрамера, вид с цитоплазматической стороны. Б – структура мономера. Номерами обозначены альфа-спирали. Структуры представлены с помощью программы PyMOL на основе PBD ID 6C70

Архитектура рецепторных комплексов Or–Orco еще не расшифрована. Предметом дискуссий является и топология самого рецепторного гетеродимера. Предполагается, что белки Or могут формировать гетеродимеры с корецептором Orco по аналогии с семиспиральным каналным родопсином, в котором пора ионного канала формируется противополож-

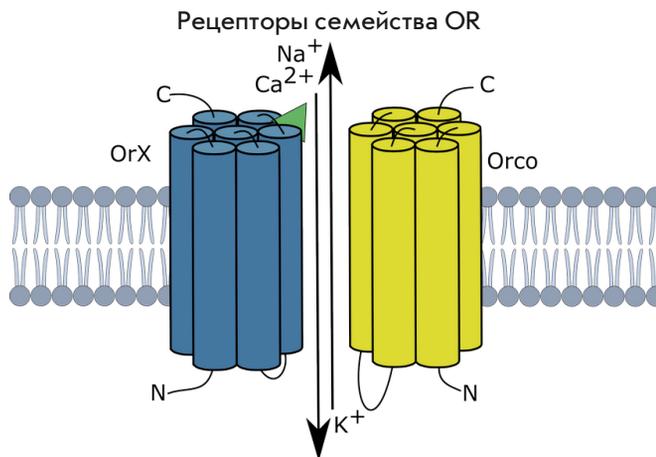


Рис. 3. Обонятельные рецепторы насекомых. OR – гетеродимеры, состоящие из константного корецептора Orco и запаха-специфичного белка Or: OrX в случае распознавания запахов пищи (также чувствителен к запахам мест откладки яиц, хищников, токсических веществ и т.д.) и OrY в случае распознавания феромонов [3]. Зеленым треугольником обозначен лиганд (молекула одоранта)

но лежащими спиральями ТМ3 и ТМ4 [10, 11]. Другой возможный вариант сборки – тетрамер, состоящий из двух димеров [12]. Относительная катионная проницаемость различных OrX варьирует [13, 14]. Мутационный анализ обонятельных рецепторов тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) показал, что пора ионного канала OR формируется обоими типами белков – OrX и Orco [15]. Экспрессия белков Orco в отсутствие белков OrX также приводит к формированию функциональных каналов, которые не связывают молекулы запаха, но могут активироваться циклическими нуклеотидами [16] или синтетическими агонистами [17–19].

Молекулярный механизм активации рецепторов OR детально не изучен. В одних работах описан исключительно ионотропный механизм работы [13], в других ясно показан метаботропный сигнальный механизм на основе пути DAG/IP3 [20, 21]. Наконец, у гетерологично экспрессирующихся OR-белков *Drosophila* обнаружены оба сигнальных механизма [16].

Второй тип обонятельных рецепторов насекомых представлен так называемыми ионотропными рецепторами (ionotropic receptors, IR), гомологичными ионотропным глутаматным рецепторам (участвующим в формировании синаптических контактов в нервной системе позвоночных и беспозвоночных) [22]. IR проявляют чувствительность к кислотам, аминам и альдегидам. Они функционируют в виде гетеротетрамеров, состоящих из запах-специфичного рецепторного белка IRX и константного корецепторного белка IRcoY [23] (рис. 5). Однако описаны рецепторы группы IR, работающие как гетеродимеры. Так, гетеродимер IR8a-IR75a реагирует на уксусную кислоту [23–25]. Пара IR8a-IR84a, специфичность которой охарактеризована в ооцитах *Xenopus laevis*, активируется фенилацетальдегидом [24]. Обонятельные сенсиллы, экспрессирующие IR8a-IR64a, распознают кислоты и свободные протоны [24, 26]. Искусственная стимуляция IR64a-положительных нейронов вызывает поведение избегания, что соответствует роли этих нейронов в выявлении кислотных раздражителей. Доказано, что IR8a ассоциируется с IR64a, способствуя тем самым стабильности IR64a [23]. В совокупности эти результаты показывают, что в IR64a-положительных нейронах IR8a функционирует как корецептор [27].

IRcoY также несет лигандсвязывающий домен, однако его основная роль заключается, по-видимому, в локализации комплекса на клеточной мембране, а не в связывании лиганда [23].

IR могут формировать тетрамеры, состоящие из двух димеров IRcoY-IRX или из одной субъединицы IRcoY и трех разных IRX-белков. У *Drosophila* корецепторные IR-белки представлены IR8a и IR25a

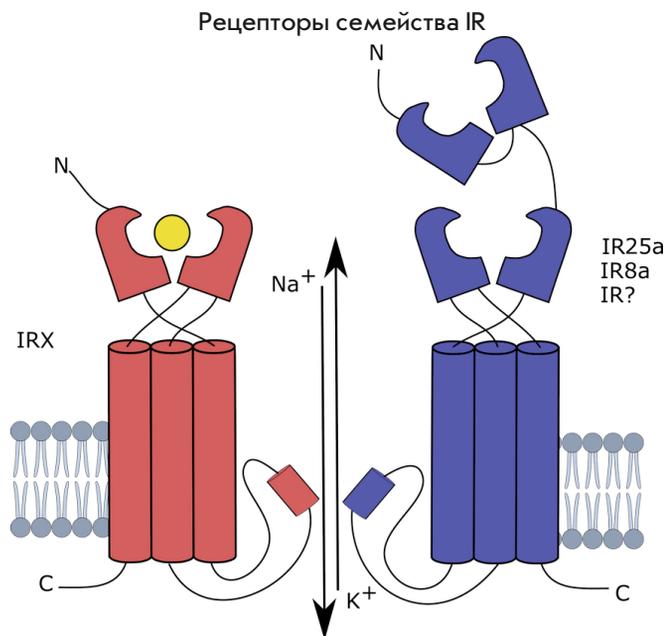


Рис. 5. Ионотропные рецепторы (IR) – гетеротетрамеры, состоящие из корецепторного белка IRcoY и рецепторного белка IRX [3]

[11]. Как IRcoY, так и IRX состоят из трех трансмембранных спиралей, разделенных внеклеточным участком, содержащим лигандсвязывающий домен (ligand-binding domain, LBD). IRcoY также имеют в своем составе массивный N-концевой домен (amino-terminal domain, ATD). IR являются неселективными катионными каналами, при активации они проводят ионы Na⁺ и K⁺, а некоторые также ионы Ca²⁺ [23].

IR и OR распознают запахи с комплементарной специфичностью – их лиганды не перекрываются. Показано, что OR-экспрессирующие обонятельные нейроны *Drosophila* лучше адаптируются к фоновым запахам, чем IR-экспрессирующие нейроны, что позволяет насекомым отслеживать изменения запаха в широком диапазоне концентраций и обнаруживать другие запахи даже при наличии определенного фона. В то же время, не имея способности к адаптации, IR точнее определяют абсолютную концентрацию запаха, что позволяет *Drosophila* эффективно отследить местонахождение пищи, полового партнера или хищников [28, 29]. Большинство рецепторов группы IR специфично активируются аминами и кислотами, рецептор IR76b специфичен к низкой концентрации NaCl [30].

Третий тип обонятельных рецепторов представлен специализированными вкусовыми рецепторами (gustatory receptors – GR), чувствительными к углекислому газу [31]. Как и OR, GR принадлежат к семейству семиспиральных рецепторов (seven-transmembrane domain receptors, 7TM receptors) с противоположной GPCR-белкам ориентации

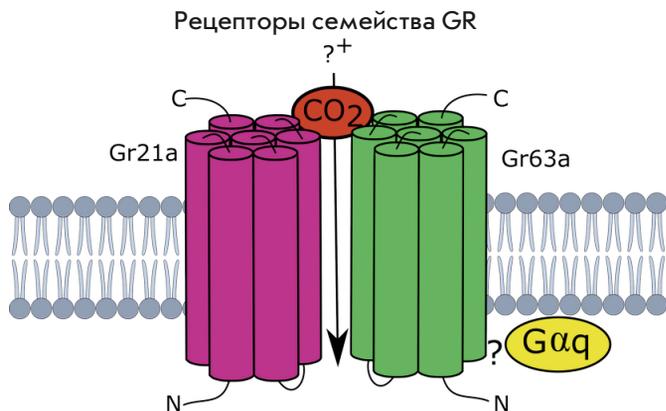


Рис. 6. Вкусные рецепторы (GR), чувствительные к углекислому газу, – гетеродимеры, состоящие из субъединиц Gr3 и Gr1/Gr2. Имеют структуру и ориентацию на мембране, сходную с OR [3]

ей на плазматической мембране. Обнаружено три *Gr*-гена, кодирующих рецепторы, чувствительные к углекислому газу [32]. Эти рецепторы также являются гетеродимерами, состоящими из субъединиц Gr1/2 и Gr3 (рис. 6), которые у *Drosophila* представлены белками Gr21a и Gr63a соответственно [31, 33].

Gr21a и Gr63a у *Drosophila* образуют комплекс с Gα_q-белками, активирующими фосфолипазу C, которая, в свою очередь, активирует ионные каналы TRP-семейства посредством фосфоинозитидного гидролиза [34–36]. Кислотные запахи и высокие концентрации углекислого газа (> 5%) распознаются рецептором IR-семейства, а именно IR64a [26].

Вкусные рецепторы

В целом, для насекомых характерна сложная вкусовая сенсорная система. Главные вкусовые орга-

ны – вкусовые сенсиллы – располагаются в основном на лапках и крыльях (рис. 7А). Рецепторные клетки представляют собой чувствительные нейроны, большая часть которых ассоциирована со вкусовыми сенсиллами [37] (рис. 7Б). Каждая сенсилла содержит несколько вкусовых рецепторных нейронов (gustatory receptor neurons – GRN), в дендритах которых экспрессируются вкусовые рецепторы – GR (gustatory receptors).

Обнаружение в 2000 году генов семейства GR [38–40] послужило настоящим прорывом в изучении вкусового поведения насекомых и физиологии их вкусового восприятия. В геноме *Drosophila* насчитывается 68 *Gr*-генов [41], некоторые из которых высококонсервативны среди членистоногих [42]. Гены *Gr* можно разделить на две большие группы. Первая группа включает большинство *Gr*-генов (около 35), которые экспрессируются в нейронах, распознающих горький и соленый вкус [43]. Вторая группа состоит из восьми генов, экспрессия которых ограничивается нейронами, чувствительными к сладкому вкусу [44] (рис. 8).

Gr-рецепторы сладкого вкуса. Сладкий вкус сахаров – наиболее изученная форма восприятия вкуса у *Drosophila*. В отличие от млекопитающих, где единственный гетеродимерный G-белок-сопряженный рецепторный комплекс опознает все сахара и даже белки, имеющие сладкий вкус [45, 46], в организме *Drosophila* найдено восемь *Gr*-белков, участвующих в определении сладкого вкуса: они кодируются генами *Gr5a*, *Gr61a* и кластером из шести генов *Gr64a–Gr64f* [44]. Все гены *Gr*-рецепторов, чувствительных к сладкому вкусу, экспрессируются в лапках, за исключением *Gr64a*, который экспрессируется в губных щупиках [44]. Функциональные рецепторы слад-

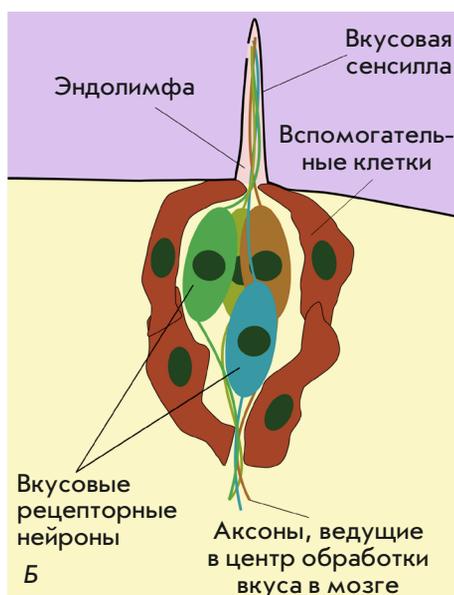
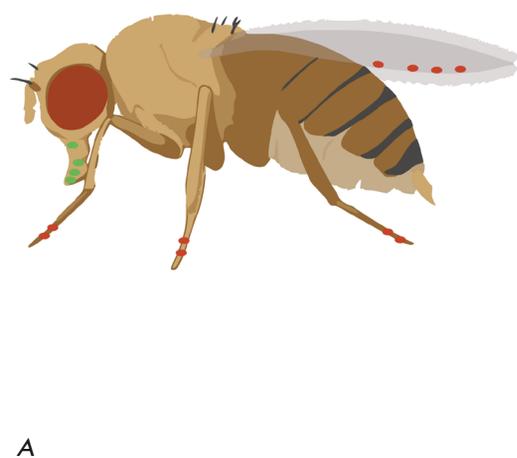


Рис. 7. Вкусные органы *D. melanogaster*. А – основные места локализации вкусовых сенсилл на теле *Drosophila* (обозначены цветными точками). Б – схема клеточной организации вкусовой сенсиллы. Адаптировано из [1]

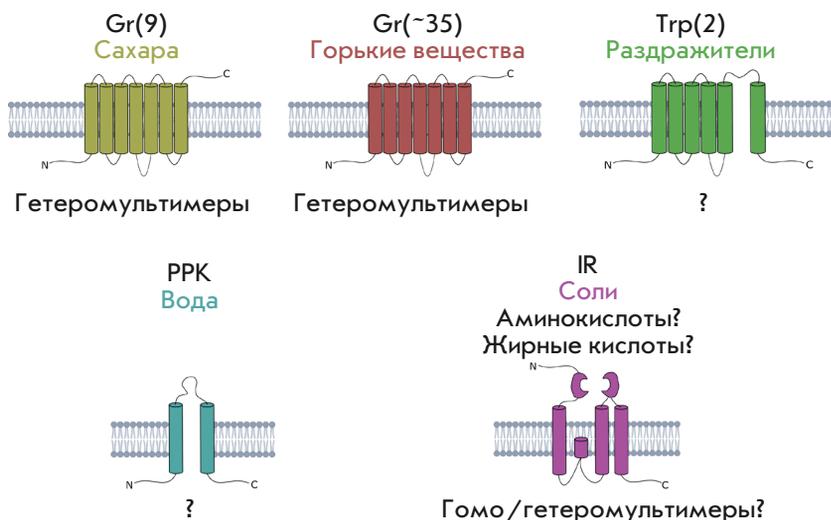


Рис. 8. Структура различных вкусовых рецепторов у взрослых особей *D. melanogaster*. Во вкусовых нейронах обнаружено как минимум четыре типа вкусовых рецепторов. Более 40 из 68 *Gr*-генов кодируют рецепторы горького и сладкого вкуса. Показано, что два гена TRP кодируют рецепторы, чувствительные к вкусовым раздражителям (аристололовая кислота и аллилизотиоцианат). Как минимум один канал (PPK28) используется для определения вкуса воды. Роль *IR*-генов в восприятии вкуса плохо изучена, однако 15 из них экспрессируются во вкусовых нейронах. Описана вкусовая специфичность как минимум одного рецептора – *IR76b*, чувствительного к вкусу поваренной соли. Адаптировано из [1]

кого вкуса являются гетеродимерами [47]. Однако известны рецепторы (*Gr43a*), которые могут функционировать самостоятельно – в качестве гомомультимеров или мономеров [48]. Ниже представлена краткая характеристика *Gr*-генов, кодирующих рецепторы сладкого вкуса (табл. 1) [1]. Данные о специфичности получены на основе нокаутов соответствующих генов.

***Gr*-рецепторы горького вкуса.** Подобно млекопитающим, *Drosophila* и другие насекомые имеют системы, хорошо настроенные на детекцию потенциально опасных веществ, обычно горьких и не имеющих какой-либо питательной ценности. Насекомые сталкиваются с широким спектром горьких веществ из различных источников. Например, многие растения

продуцируют горькие вещества в качестве вторичных метаболитов, которые они используют для защиты от травоядных насекомых [1]. Для *Drosophila* и других насекомых, употребляющих плоды растений, источником опасных горьких веществ зачастую являются микроорганизмы, населяющие гниющие плоды. Горькие вещества представлены широким набором компонентов с разнообразной структурой, таких, как алкалоиды, терпеноиды и фенолы. Поэтому большинство вкусовых рецепторов (порядка 35) чувствительны к горьким веществам [49]. Однако только четыре *Gr*-рецептора горького вкуса охарактеризованы функционально. Эти рецепторы представлены в табл. 2.

Предполагается, что *Gr*-рецепторы горького вкуса состоят из нескольких субъединиц. Коровыми субъе-

Таблица 1. Краткая характеристика *Gr*-генов, кодирующих рецепторы сладкого вкуса

Ген	Лиганд	Белок-партнер
<i>Gr5a</i>	Трегалоза	<i>Gr64f</i>
<i>Gr61a</i>	Глюкоза	?
<i>Gr64a</i>	Мальтоза Фруктоза	<i>Gr64e</i>
<i>Gr64b</i>	Глицерин	<i>Gr64e</i>
<i>Gr64c</i>	Сахароза Мальтоза Арабиноза	?
<i>Gr64e</i>	Глицерин	<i>Gr64a/Gr64b</i>
<i>Gr64f</i>	Глюкоза Сахароза Фруктоза Мальтоза Трегалоза Мелицитоза	<i>Gr5a</i>
<i>Gr43a</i>	Фруктоза Сахароза	Отсутствует

Таблица 2. *Gr*-рецепторы горького вкуса

Ген	Лиганд	Белок-партнер
<i>Gr8a</i>	<i>L</i> -канаванин	?
<i>Gr66a</i>	Кофеин Диэтилтолуамид Папаверин Стрихнин Лобелин	?
<i>Gr93a</i>	Кофеин	?
<i>DmRX</i>	<i>L</i> -канаванин	Отсутствует

Примечание: *L*-канаванин – непротеиногенная аминокислота, содержащаяся в некоторых бобовых растениях; является инсектицидом. Диэтилтолуамид – искусственно синтезированное органическое соединение, обладающее репеллентным и инсектицидным действием.

диницами таких мультимерных рецепторов являются Gr33a и Gr66a [49, 50].

Трансдукция вкусового сигнала. Сигнальный механизм вкусовых Gr-рецепторов изучен недостаточно. Существуют две причины недостатка знаний в этой области. Во-первых, вкусовые нейроны *Drosophila* не поддаются электрофизиологическим исследованиям методом пэтч-кламп, что не позволяет изучать нейрофизиологические процессы, лежащие в основе активации рецепторов. Во-вторых, большинство попыток экспрессировать вкусовые рецепторы в гетерологичной системе оказались неудачными. Исключение составляют представители так называемой Gr43a-подобной клады, семейства рецепторов, которое филогенетический анализ относит к вкусовым рецепторам фруктозы [51].

Имеющиеся данные дают основания предположить, что рецепторы, принадлежащие к Gr43a-подобной кладе (консервативной у многих насекомых с полным превращением), представляют собой ионотропные гомосубъединичные хеморецепторы. Ортологами гена *DmGr43a* *D. melanogaster* являются *VmGr9* у *B. mori*, *HarmGr4* у *Helicoverpa armigera* и *AmGr3* у *Apis mellifera*. Паралоги *DmGr43a* обнаружены недавно у *Tribolium castaneum* (*TcGr20*) и *B. mori* (*VmGr10*). В 2011 году японским ученым удалось осуществить гетерологичную экспрессию гена *VmGr9* тутового шелкопряда (*B. mori*) и его ортолога *DmGr43a* из *Drosophila*, белковые продукты которых связывают *D*-фруктозу [52]. Ген *VmGr9* экспрессировали в клетках эмбриональной почки человека (линия НЕК293Т) и в ооцитах *Xenopus*; *DmGr43a* – в клеточной линии COS-7 (фибробластоподобные клетки из почки обезьяны). При помощи метода пэтч-кламп показано, что лигандом *VmGr9* и *DmGr43a* служит *D*-фруктоза. Запись динамики флуоресценции кальциевого индикатора при добавлении лиганда подтвердила результаты электрофизиологических опытов. Показано, что рецептор *VmGr9* функционирует как лиганд-зависимый катионный канал: ингибирование G-белкопосредованной сигнализации при помощи агента U73122 (ингибитор фосфолипазы C) не препятствовало входу ионов Ca²⁺ при аппликации фруктозы на клетки, экспрессирующие *VmGr9*. Кроме того, добавление аналога циклических нуклеотидов и активатора аденилатциклазы (необходимых участников сигнализации, сопряженной с G-белком) не привело к появлению кальциевого ответа у клеток, экспрессирующих рецептор.

Позднее показали, что рецептор *VmGr10*, ген которого является паралогом *VmGr9*, чувствительный к *мио*- и *эпи*-инозитолу, также относится к лиганд-

Таблица 3. Gr-рецепторы сладкого вкуса с изученным механизмом трансдукции сигнала

Рецептор	Лиганд	Природный источник	Ссылка
VmGr9	<i>D</i> -фруктоза	<i>B. mori</i> (тутовый шелкопряд)	[52]
VmGr10	<i>мио</i> -инозитол <i>эпи</i> -инозитол	<i>B. mori</i> (тутовый шелкопряд)	[53]
TcGr20	Маннитол Сорбитол	<i>T. castaneum</i> (хрущак малый булавоусый)	[54]

зависимым катионным каналам [53]. На ионотропный характер работы рецептора указывает также входящий кальциевый ток, наблюдаемый при применении ингибитора G-белковых каскадов (U73122).

Gr-рецепторы насекомых активно изучаются. Так, недавно показали, что рецептор *TcGr20* *T. castaneum* чувствителен к сорбитолу и маннитолу [54]. *T. castaneum* (хрущак малый булавоусый), распространенный вредитель сухих сыпучих продуктов, имеет 207 Gr-генов. По-видимому, такой широкий репертуар вкусовых рецепторов необходим видам, которые относятся к универсальным потребителям (поедают различные типы продуктов и не привязаны к определенному источнику питания) (табл. 3) [54].

Таким образом, представители клады Gr43a являются вкусовыми рецепторами насекомых с наиболее хорошо изученным механизмом функционирования. Более того, возможность гетерологичной экспрессии их генов и такие свойства этих хеморецепторов, как ионотропность и гомосубъединичность, позволяют подробно изучать их в различных модельных системах *in cellulo* и *in vitro* и даже разрабатывать электрофизиологические инструменты на их основе.

Особенности экспрессии генов хеморецепторов насекомых

Насекомые и позвоночные животные различаются не только строением хеморецепторов, но и стратегиями экспрессии их генов. Так, в каждом из приблизительно 10 млн обонятельных нейронов позвоночного экспрессируется строго один ген рецептора. Выполнение правила «один рецептор – один нейрон» обеспечивается регуляцией на уровне транскрипции. Предполагается, что после выбора функционального типа рецептора, экспрессируемого в конкретной клетке, транскрипция остальных генов рецепторов подавляется по принципу обратной связи [55]. Механизм, благодаря которому нейрон «выбирает» свой обонятельный рецептор и блокирует экспрессию рецепторов всех остальных специфичностей,

до сих пор плохо понятен [56]. Скорее всего, соблюдение правила «один рецептор – один нейрон» важно для точного «декодирования» обонятельных сигналов, при котором одна популяция обонятельных нейронов реагирует на ограниченное число одорантов, а обонятельный центр однозначно идентифицирует происхождение поступающих сигналов [56].

У *Drosophila* большая часть из ~2600 имеющихся обонятельных нейронов экспрессирует два гена обонятельных рецепторов: один – специфичный к клеточному типу (вариабельная субъединица Or), второй – ген *Or83b* (константная субъединица Orco). Димеризация белкового продукта *Or83b* со специфическим рецептором обеспечивает транспорт функционального комплекса в обонятельные сенсиллы [6]. Этот принцип на первый взгляд кажется синонимичным описанному выше правилу «один рецептор – один нейрон» позвоночных, однако у *Drosophila* условия экспрессии более гибкие. Например, в шести из восьми классов обонятельных нейронов антенн экспрессируются два гена вариабельной субъединицы Or в дополнение к *Or83b* [57]. При этом все нейроны конкретной сенсиллы всегда экспрессируют один и тот же вариабельный рецепторный ген, хотя подавления экспрессии остальных генов по принципу обратной связи, свойственного позвоночным, у *Drosophila* не обнаружено [58].

В геноме *Drosophila* семейство OR-белков кодируется 60 генами и несколькими псевдогенами. Семейство состоит из 62 рецепторных белков (при этом в результате альтернативного сплайсинга мРНК *Or46a* и *Or69a* образуются по два белка [41]). Некоторые OR-гены сгруппированы в кластеры по два или три гена (вероятно, потому что они появились в результате дубликации), но большинство генов все же широко рассредоточено по геному [41]. Показано, что 45 представителей семейства OR-генов экспрессируются в антеннах и верхнечелюстных щупиках взрослых животных, в то время как 25 генов функционируют только в обонятельной системе личинки [57].

Интересно, что рецепторы семейства OR обнаружены только у летающих насекомых. Предполагается, что двойная система трансдукции, характерная для OR, является приспособлением к распознаванию источника запаха в полете [59, 60].

Семейство генов IR-рецепторов чрезвычайно дивергентно, идентичность кодируемых ими аминокислотных последовательностей варьирует от 10 до 70%. Подобно генам OR-рецепторов, IR-гены разбросаны по геному *Drosophila*, в основном, в форме индивидуальных генов, однако некоторые также формируют кластеры [22]. Геномный анализ *Drosophila* выявил 66 генов семейства IR, включая 9 предполагаемых

псевдогенов [22]. При этом 16 представителей семейства экспрессируются в обонятельных нейронах антенн (IR-рецепторы, чувствительные к органическим кислотам и аминам), а 44 во вкусовых органах (32 на стадии личинки, 27 во взрослом организме) – в сосательных лопастях, лапках, передних крыльях, трубке пищевода [61].

Геном *Drosophila* содержит также 60 генов семейства GR, в результате альтернативного сплайсинга которых образуются 68 белков [61]. Соответствующие белки чрезвычайно дивергентны по аминокислотной последовательности (идентичность 8%). Гены семейства GR экспрессируются во вкусовых органах взрослых животных (сосательные лопасти, лапки, передние крылья, трубка пищевода), во вкусовых органах личинок, а также в различных тканях взрослых животных, включая антенны, верхнечелюстные щупики, энтероэндокринные клетки кишечника, мультидендритные клетки брюшной стенки тела, в нейронах, иннервирующих репродуктивные органы, и даже в мозге [61].

На экспрессию хеморецепторов влияет физиологическое состояние насекомого, зависящее, в свою очередь, от воздействия внешних средовых факторов. Так, изучение уровней мРНК 21 рецептора IR, 12 GR и 43 OR в антеннах восточной плодовой мухи *Bactrocera dorsalis* выявило существенную зависимость экспрессии от пищевого и полового поведения насекомых и даже от времени суток [62]. Интересно, что направление регуляции и ее количественные характеристики у рецепторов разного типа и особей разного пола оказались совершенно непохожими. Эти данные, предположительно, иллюстрируют динамическую адаптацию физиологии насекомого к изменению внешних условий, обеспечивающую известную гибкость в реализации поведенческих программ.

Анализ транскриптомов эусоциальных насекомых, в частности термитов *Reticulitermes speratus*, выявил дифференциальную экспрессию генов OR, IR и GR, связанную с полом, возрастом и специализацией (кастовой принадлежностью) исследуемых индивидов [63]. Вероятно, подобные особенности экспрессии могут быть характерны и для других общественных насекомых (муравьев, пчел и др.), а архитектура хеморецепторной системы играет важную роль в формировании полиэтизма и построении сообщества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Насекомые обладают сложно организованной системой хеморецепции, построенной на основе белков из трех суперсемейств (табл. 4). Для этой системы характерно нестрогое соответствие типа рецептора его функциональной роли. Так, ионотропные рецепторы (IR) вовлечены как в обоняние (кислотные запа-

Таблица 4. Сравнительные характеристики трех основных групп хеморецепторов насекомых

Суперсемейство хеморецепторов	OR (odorant receptors)	IR (ionotropic receptors)	GR (gustatory receptors)
Роль в хеморецепторной системе насекомых	Распознавание запахов пищи и феромонов	Распознавание запахов (кислоты и амины) и слабого вкуса NaCl	Распознавание вкуса и углекислого газа в воздухе
Четвертичная структура/олигомерный статус	Гетеродимеры	· Гетеротетрамеры · Гетеродимеры (кислотные запахи)	· Мономеры (Gr43a-подобные) · Гетеродимеры (сладкий вкус, углекислый газ)
Механизм реализации ответа	Ионотропный + метаботропный	Ионотропный	· Ионотропный (Gr43a-подобные) · Метаботропный (рецепторы углекислого газа)
Тип чувствительных нейронов, ответственных за передачу сигнала в центральной нервной системе	Обонятельные чувствительные нейроны (olfactory sensory neurons – OSN)		Вкусовые рецепторные нейроны (gustatory receptor neurons – GRN)
Локализация чувствительных нейронов в организме насекомого	Придатки лба, антенны, верхнечелюстные щупики		Лапки и крылья
Модельные системы, на которых проводились исследования	· «Пустой» нейрон* <i>D. melanogaster</i> · Ооцит <i>X. laevis</i> · Клетки млекопитающих (НЕК293 и др.)	· «Пустой» нейрон* <i>D. melanogaster</i> · Ооцит <i>X. laevis</i>	· «Пустой» нейрон* <i>D. melanogaster</i> · Ооцит <i>X. laevis</i> · Клетки млекопитающих (НЕК293 и др.)

*Обонятельный нейрон *D. melanogaster*, не экспрессирующий эндогенные обонятельные рецепторы.

хи, запахи аминов), так и в восприятие вкуса (низкие концентрации хлорида натрия). Аналогичная ситуация и с рецепторами GR, которые, соответствуя своему названию, задействованы в основном во вкусовом восприятии (горький и сладкий вкус), но вместе с тем участвуют и в обонянии (углекислый газ). Только рецепторы OR являются строго обонятельными.

Архитектура хемосенсорной системы отражает выработку ряда эволюционных адаптаций, позволяющих насекомым точно и адекватно реагировать на внешнюю химическую стимуляцию. Так, рецепторы GR и IR проявляют комплементарную чувствительность в отношении углекислого газа и кислотных запахов: низкие концентрации углекислоты распознаются гетеродимерами GR (например, Gr21a и Gr63a у дрозофилы), а высокие – гетеродимерами IR (у дрозофилы IR8a–IR64a). Обонятельные рецепторы семейств IR и OR, в свою очередь, проявляют комплементарную специфичность и неодинаковую способность к сенситизации, которые, по всей вероятности, дают насекомым возможность точно определять изменение концентрации специфических одорантов даже в присутствии широкого спектра «фоновых» молекул.

К эволюционным адаптациям, вероятно, можно отнести и необычные механизмы трансдукции сигнала, характерные для хеморецепторов насекомых. Так, обонятельные рецепторы OR используют одновременно и ионотропный, и метаботропный пути

трансдукции «химического» сигнала. Первый, по-видимому, важен для быстрой реакции на высокие концентрации одоранта, тогда как второй обеспечивает амплификацию сигнала при распознавании слабых запахов. Молекулярные механизмы функционирования рецепторов IR и GR изучены существенно хуже, но имеющиеся данные в целом говорят о предпочтительно ионотропном пути трансдукции их сигнала. Это, впрочем, не исключает и альтернативных механизмов. Так, для рецепторов углекислого газа из суперсемейства GR характерен метаботропный ответ, опосредованный G_q-белками и активирующий ионные каналы семейства TRP. Предполагается, что обонятельные рецепторы IR также могут взаимодействовать с G-белками [64].

Ионотропный путь трансдукции сигнала в той или иной степени характерен для всех типов хеморецепторов насекомых. Этот факт определяет существенное своеобразие их хемосенсорной системы. Отметим, однако, что на «хеморецепторной карте» членистоногих в целом и насекомых в частности остается значительное количество белых пятен. И специфичность, и молекулярная структура, и сигнальные пути этих рецепторов активно изучаются. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-34-20087.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frank Z., Munger S. Chemosensory transduction: the detection of odors, tastes, and other chemostimuli. London (UK): Elsevier, 2016. 404 p.
2. Silbering A.F., Benton R. // *EMBO Rep.* 2010. V. 11. № 3. P. 173–179.
3. Wicher D. // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2015. V. 130. P. 37–54.
4. Kaupp U.B. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2010. V. 11. № 3. P. 188–200.
5. Larsson M.C., Domingos A.I., Jones W.D., Chiappe M.E., Amrein H., Vosshall L.B. // *Neuron.* 2004. V. 43. № 5. P. 703–714.
6. Neuhaus E.M., Gisselmann G., Zhang W., Dooley R., Störtkuhl K., Hatt H. // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. № 1. P. 15–17.
7. Benton R., Sachse S., Michnick S.W., Vosshall L.B. // *PLoS Biol.* 2006. V. 4. № 2. P. 240–257.
8. Lundin C., Käll L., Kreher S.A., Kapp K., Sonnhammer E.L., Carlson J.R., von Heijne G., Nilsson I. // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. № 29. P. 5601–5604.
9. Butterwick J.A., Märmol J., Kim K.H., Kahlson M.A., Rogow J.A., Walz T., Ruta V. // *Nature.* 2018. V. 560. № 7719. P. 447–452.
10. Kato H.E., Zhang F., Yizhar O., Ramakrishnan C., Nishizawa T., Hirata K., Ito J., Deisseroth K., Nureki O. // *Nature.* 2012. V. 482. № 7385. P. 369–374.
11. Müller M., Bamann C., Bamberg E., Kühlbrandt W. // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 414. № 1. P. 86–95.
12. Penna A., Demuro A., Yeromin A.V., Zhang S.L., Safrina O., Parker I., Cahalan M.D. // *Nature.* 2008. V. 456. № 7218. P. 116–120.
13. Sato K., Pellegrino M., Nakagawa T., Nakagawa T., Vosshall L.B., Touhara K. // *Nature.* 2008. V. 452. № 7190. P. 1002–1006.
14. Rinker D.C., Zwiebel L.J., Pask G.M., Jones P.L., Rützler M. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 12. P. 4–10.
15. Nakagawa T., Pellegrino M., Sato K., Vosshall L.B., Touhara K. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 3. P. 1–9.
16. Wicher D., Stensmyr M.C., Heller R., Heinemann S.H., Scha R., Hansson B.S. // *Nature.* 2008. V. 452. № 7190. P. 1007–1012.
17. Jones P.L., Pask G.M., Rinker D.C., Zwiebel L.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 21. P. 8821–8825.
18. Chen S., Luetje C.W. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 5. P. 1–9.
19. Taylor R.W., Romaine I.M., Liu C., Murthi P., Jones P.L., Waterson A.G., Sulikowski G.A., Zwiebel L.J. // *ACS Chem. Biol.* 2012. V. 7. № 10. P. 1647–1652.
20. Stengl M. // *J. Comp. Physiol. A.* 1994. V. 174. № 2. P. 187–194.
21. Krieger J., Breer H. // *Science.* 1999. V. 286. № 5440. P. 720–723.
22. Benton R., Vannice K.S., Gomez-Diaz C., Vosshall L.B. // *Cell.* 2009. V. 136. № 1. P. 149–162.
23. Abuin L., Ulbrich M.H., Isacoff E.Y., Kellenberger S., Benton R. // *Neuron.* 2011. V. 69. № 1. P. 44–60.
24. Silbering A.F., Rytz R., Grosjean Y., Abuin L., Ramdya P., Jefferis G.S., Benton R. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 38. P. 13357–13375.
25. Prieto-Godino L.L., Rytz R., Bargeton B., Abuin L., Arguello J.R., Peraro M.D., Benton R. // *Nature.* 2016. V. 539. № 7627. P. 93–97.
26. Ai M., Min S., Grosjean Y., Leblanc C., Bell R., Benton R., Suh G.S.B. // *Nature.* 2010. V. 468. № 7324. P. 691–695.
27. Rimal S., Lee Y. // *Insect. Mol. Biol.* 2018. V. 27. № 1. P. 1–7.
28. Cao L., Jing B., Yang D., Zeng X., Shen Y., Tu Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 113. № 7. P. 902–911.
29. Getahun M.N., Wicher D., Hansson B.S., Olsson S.B., Fontanini A., Brook S. // *Front. Cell Neurosci.* 2012. V. 6. № 54. P. 1–11.
30. Zhang Y.V., Ni J., Montell C. // *Science.* 2013. V. 340. № 6138. P. 1334–1338.
31. Jones W.D., Cayirlioglu P., Kadow I.G., Vosshall L.B. // *Nature.* 2007. V. 445. № 7123. P. 86–90.
32. Robertson H.M., Kent L.B. // *J. Insect. Sci.* 2009. V. 9. № 19. P. 1–14.
33. Kwon J.Y., Dahanukar A., Weiss L.A., Carlson J.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 9. P. 3574–3578.
34. Yao C.A., Carlson J.R. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 13. P. 4562–4572.
35. Sturgeon R.M., Magoski N.S. // *J. Neurosci.* 2018. V. 38. № 35. P. 7622–7634.
36. Badsha F., Kain P., Prabhakar S., Sundaram S., Padinjat R., Rodrigues V., Hasan G. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 11. P. 1–11.
37. Stocker R.F. // *Cell Tissue Res.* 1994. V. 275. № 1. P. 3–26.
38. Clyne P.J., Warr C.G., Carlson J.R. // *Science.* 2000. V. 287. № 5459. P. 1830–1834.
39. Scott K., Brady R., Cravchik A., Morozov P., Rzhetsky A., Zuker C., Axel R. // *Cell.* 2001. V. 104. № 5. P. 661–673.
40. Dunipace L., Meister S., Mcnealy C., Amrein H. // *Curr. Biol.* 2001. V. 11. № 11. P. 822–835.
41. Robertson H.M., Warr C.G., Carlson J.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 14537–14542.
42. Kent L.B., Robertson H.M. // *BMC Evol. Biol.* 2009. V. 9. № 41. P. 1–20.
43. Weiss L.A., Dahanukar A., Kwon J.Y., Banerjee D., Carlson J.R. // *Neuron.* 2011. V. 69. № 2. P. 258–272.
44. Fujii S., Yavuz A., Slone J., Jagge C., Song X., Amrein H. // *Curr. Biol.* 2015. V. 25. № 5. P. 621–627.
45. Nelson G., Hoon M.A., Chandrashekar J., Zhang Y., Ryba N.J., Zuker C.S. // *Cell.* 2001. V. 106. № 3. P. 381–390.
46. Montmayeur J., Liberles S.D., Matsunami H., Buck L.B. // *Nat. Neurosci.* 2001. V. 4. № 5. P. 492–498.
47. Yavuz A., Jagge C., Slone J., Amrein H. // *Fly (Austin).* 2015. V. 8. № 4. P. 189–196.
48. Miyamoto T., Slone J., Song X., Amrein H. // *Cell.* 2012. V. 151. № 5. P. 1113–1125.
49. Moon S.J., Lee Y., Jiao Y. // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. № 19. P. 1623–1627.
50. Lee Y., Jun S., Montell C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 11. P. 4495–4500.
51. Smadja C., Shi P., Butlin R.K., Robertson H.M. // *Mol. Biol. Evol.* 2008. V. 26. № 9. P. 2073–2076.
52. Sato K., Tanaka K., Touhara K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 28. P. 11680–11685.
53. Kikuta S., Endo H., Tomita N., Takada T., Morita C., Asaoka K., Sato R. // *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 2016. V. 74. P. 12–20.
54. Takada T., Sato R., Kikuta S. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 10. P. 1–16.
55. Serizawa S., Miyamichi K., Nakatani H., Suzuki M., Saito M., Yoshihara Y., Sakano H. // *Science.* 2003. V. 302. № 5653. P. 2088–2094.
56. Touhara K., Vosshall L.B. // *Annu. Rev. Physiol.* 2009. V. 71. P. 307–332.
57. Couto A., Alenius M., Dickson B.J. // *Curr. Biol.* 2005. V. 15. № 17. P. 1535–1547.
58. Dobritsa A.A., van der Goes van Naters W., Warr C.G., Steinbrecht R.A., Carlson J.R., Haven N., Vic C. // *Neuron.* 2003. V. 37. № 5. P. 827–841.
59. Missbach C., Dweck H.K.M., Vogel H., Vilcinskis A., Stensmyr M.C., Hansson B.S., Grosse-Wilde E. // *eLife.* 2014. V. 3. P. 1–22.
60. Getahun M.N., Thoma M., Lavista-Llanos S., Keeseey I., Fandino R.A., Knaden M., Wicher D., Olsson S.B., Hansson B.S. // *J. Exp. Biol.* 2016. V. 219. № 21. P. 3428–3438.
61. Joseph R.M., Carlson J.R. // *Trends Genet.* 2015. V. 31. № 12. P. 683–695.
62. Jin S., Zhou X., Gu F., Zhong G., Yi X. // *Front. Physiol.* 2017. V. 8. № 627. P. 1–12.
63. Mitaka Y., Kobayashi K., Mikheyev A., Tin M.M.Y., Watanabe Y., Matsuura K. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 1. P. 1–16.
64. Byrne J.H. *The Oxford Handbook of Invertebrate Neurobiology.* Oxford (UK): Oxford University Press, 2017. 792 p.

УДК 612.831:577.25:57.084.1

Цитокиновый профиль как маркер клеточного повреждения и иммунной дисфункции при травмах спинного мозга

Г. Б. Телегин^{1*}, А. С. Чернов¹, Н. А. Коновалов², А. А. Белогуров³, И. П. Балмасова⁴,
А. Г. Габибов³

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, 142290 Россия

²Национальный научно-практический медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко Минздрава России, Москва, 125047 Россия

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

⁴Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, 127473 Россия

*E-mail: telegin@bibch.ru

Поступила в редакцию 20.07.2020

Принята к печати 08.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11096

РЕФЕРАТ Обобщены результаты экспериментальных исследований последних лет, посвященных изучению цитокинового профиля при травме спинного мозга. Проанализирована роль ведущих цитокинов в формировании клеточного ответа на травму. Рассмотрены данные иммунопатогенетических особенностей взаимодействия нервной и иммунной систем организма в остром и хроническом периодах после травмы. Показана целесообразность поэтапного подхода к оценке цитокинового профиля при травме спинного мозга, а также необходимость учета сочетания патогенетического и протективного компонентов в реализации регуляторных эффектов отдельных цитокинов, их интеграции в регенеративные процессы в поврежденном спинном мозге, что позволяет рационально подойти к организации лечебного процесса и разработке новых лекарственных препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА травма спинного мозга, цитокины, клеточный ответ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СМ – спинной мозг; ТСМ – травма спинного мозга; ЦНС – центральная нервная система.

ВВЕДЕНИЕ

Травма спинного мозга (ТСМ) – серьезная глобальная проблема здравоохранения, которая часто приводит к тяжелой пожизненной инвалидизации пациентов [1, 2]. По данным ВОЗ, ежегодно до 500 000 человек в мире, в том числе молодые люди в возрасте от 20 до 35 лет, получают повреждение спинного мозга (СМ) [3].

Широкие возможности изучения морфологических и патофизиологических изменений при ТСМ, необходимых для разработки подходов к рациональному лечению, открыли переход от клинических наблюдений к созданию экспериментальных моделей [4]. Такой подход позволил установить многие патогенетически значимые механизмы развития данной патологии, в том числе связанные с иммунными ре-

акциями на повреждение, которые привели к разграничению этих реакций на острые и хронические [5].

1. ИММУННОЕ И ЦИТОКИНОВОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА НА ЭТАПЕ ОСТРЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

В патогенезе травматического повреждения СМ в острый период развития выделяют две стадии, каждая из которых приводит к сложному патофизиологическому комплексу реакций в ответ на повреждение нервной ткани [6, 7].

Первая стадия травмы, в первые сутки от момента механического воздействия, включает механизмы самого повреждения и связанных с ним нарушений. Нейроны, астроциты, олигодендроциты и другие компоненты, необходимые для передачи нервного

[29]. Сопутствующим эффектом ТСМ, реализуемым с участием микроРНК (miR-210), служит ангиогенез [30, 31].

Следует особо подчеркнуть, что эндогенные клетки (нейроны, глиальные клетки) спинного мозга человека, но не лейкоциты крови, способствуют ранней продукции IL-1 β , IL-6 и TNF- α в посттравматической воспалительной реакции [32–34].

В то же время не следует игнорировать и роль клеток иммунной системы как источника провоспалительных цитокинов при ТСМ. Этому способствуют кровоизлияния в ткань СМ при его повреждении [35, 36], которые обеспечивают инфильтрацию пораженных участков нейтрофилами, моноцитами/макрофагами, Т-лимфоцитами [37–40], т.е. клетками, высвобождающими все те же TNF- α , IL-1 α , IL-1 β и IL-6 [41, 42].

В целом отмечается, что указанные цитокины достигают своего пика через 6–12 ч после травмы, дополнительно индуцируя воспалительную реакцию в период от острой до подострой фазы и расширяя очаг поражения в ростральном и каудальном направлении [43–45]. При этом показано, что активированная микроглия и инфильтрирующие спинной мозг макрофаги ответственны за последующие некроз и апоптоз нейронов, астроцитов и олигодендроцитов, находящихся вблизи очага поражения [46, 47], ухудшая неврологический исход [48, 49].

Что касается сигналов высвобождения цитокинов, то они могут поступать в клетки через Toll-подобные рецепторы (TLR) СМ [50, 51]. TLR наиболее известны как структуры для распознавания патогенов и инициации врожденного иммунного ответа [52, 53]. Однако они также способны обнаруживать повреждение тканей и вызывать стерильное воспаление при связывании эндогенных лигандов, присущих стрессовым или поврежденным клеткам. Помимо клеток, связанных с иммунной системой, TLR идентифицированы в нейронах центральной нервной системы (ЦНС) и глиальных компонентах, включая микроглию, астроциты и олигодендроциты [54, 55]. Учитывая сказанное, роль Toll-подобных рецепторов при ТСМ может быть как прямой, так и опосредованной [56]. Косвенные эффекты, скорее всего, опосредованы микроглией или клетками иммунной системы, которые проникают в поврежденную ЦНС [57]. Установлено также, что восстановительные реакции при ишемических нарушениях в случае повреждения СМ реализуются с преимущественным участием Toll-подобных рецепторов типа 3 и последующей регуляцией при посредстве TLR4 [58].

Модуляция провоспалительных и иммунных эффектов в самой ткани СМ при его травме происходит с участием интерферонов благодаря росту в ней

содержания стимуляторов гена интерферона (Sting) [59, 60].

В течение первых 24 ч после ТСМ наблюдается еще один иммунологический эффект: происходит значительное увеличение числа натуральных киллеров (NK-клеток) с активированным фенотипом, что проявляется усиленной экспрессией CD69, HLA-DR, NKG2D и NKp30 на их мембране и ростом цитотоксической активности [61]. При этом в образцах плазмы пациентов был повышен уровень нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), который может вырабатываться клетками эндотелия сосудов, и на этой стадии ТСМ сильно коррелировал с процентным содержанием NK-клеток, а также с экспрессией на их поверхности активирующих молекул CD69 и NKp30 [62].

Ранние меры по снижению воспаления и предотвращению апоптоза уже давно являются общепринятой тактикой целевого вмешательства медиков при травме спинного мозга, но рост знаний в этой области свидетельствует о том, что у воспалительного процесса есть несомненные защитные аспекты, которые не следует игнорировать при лечении [63].

Один из механизмов врожденной иммунной защиты в ходе воспалительной реакции при ТСМ связан с уникальной ролью тучных клеток [64]. Тучные клетки в избытке встречаются в ЦНС и играют довольно сложную роль в развитии нейровоспалительных состояний. В частности, показано, что у мышей с дефицитом тучных клеток увеличены астроглиоз и Т-клеточная инфильтрация, а также значительно снижено функциональное восстановление после ТСМ [65]. Кроме того, у таких мышей в СМ значительно повышены уровни цитокинов MCP-1, NF α , IL-10 и IL-13. Получены данные о связи этих явлений с тем, что при сохраненных количествах и функциях тучных клеток их химазы расщепляют MCP-1, IL-6 и IL-13, что указывает на защитную роль этих клеточных элементов в развитии воспалительных изменений в нервной ткани при травмах СМ [66].

Характер продукции цитокинов и гормонов при ТСМ во многом зависит не только от состояния индуцирующих и иммунных механизмов, но и от уровня повреждения. Так, на крысиной модели очень четко выявлялись подобные различия в продукции фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), лептина, индуцируемый интерфероном- γ хемокина IP-10, IL-10, IL-18, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) и хемокина факталакина в плазме крови. При этом травме шейного отдела сопутствует пониженная экспрессия названных медиаторов в отличие от травмы грудного отдела, что, вероятно, возникало из-за симпатической дисрегуляции, связанной с более высоким уровнем

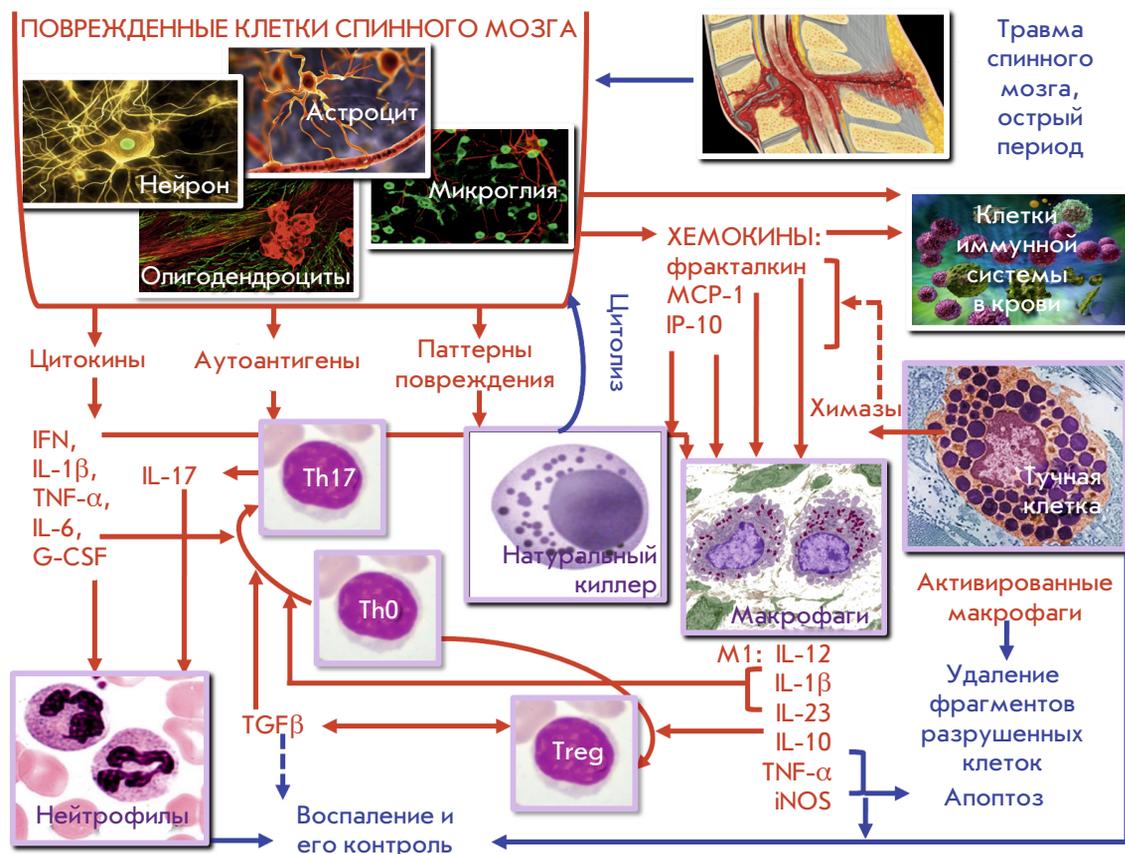


Рис. 2. Особенности иммунного ответа в острую фазу травмы спинного мозга

нанесения травмы [67, 68]. В экспериментах на мышах также показано, что вовлеченность цитокинового профиля в системные изменения после травмы спинного мозга в нижнегрудном отделе (Th9/10) таких интерлейкинов, как IL-3, IL-6, IL-10, IL-13, G-CSF, сопутствовала активации Т-лимфоцитов и нейтрофилов в острую фазу наблюдаемых изменений [69].

Стоит отметить, что в дополнение к астроцитам и микроглие, IL-10 продуцируется макрофагами, В-клетками и клетками Th2 [70, 71]. Будучи иммуномодулятором, IL-10 стимулирует образование регуляторных Т-клеток, подавляет активность Th1 и NK-клеток [72].

Таким образом, в острую фазу ТСМ реализуются иммунопатогенетические механизмы, связанные, в первую очередь, с клетками врожденного иммунного ответа и преимущественно провоспалительными цитокинами. Попытка обобщить связующие механизмы этих патогенетически значимых реакций иммунной системы на ТСМ, описанные в современной научной литературе, представлена на рис. 2. Комментируя эту схему, можно добавить следующие сведения, касающиеся собственно взаимодействия иммуноцитов.

Поврежденные нейроны и нейроглиальные клетки при ТСМ служат источником хемокинов – фрактал-

кина, MCP-1, IP-10 [67, 69], адресованные моноцитам/макрофагам, а также лимфоцитам и способствующие их поступлению в очаг повреждения. В очаге повреждения одними из первых (среди клеток врожденного иммунитета) свое действие проявляют тучные клетки, которые, как уже упоминалось, могут контролировать процесс продукции хемокинов, однако роль тучных клеток далеко неоднозначна. Эти клетки сами по себе могут служить источником цитокинов и других медиаторов, способствующих воспалению [73], с другой стороны, химазы тучных клеток, выделяющиеся в процессе их активации и сопутствующей ей дегрануляции, могут разрушать хемокины и провоспалительные цитокины, ограничивая интенсивность воспалительных реакций [66].

Большинство хемокинов, продуцируемых клетками травмированного спинного мозга, способствуют привлечению моноцитов/макрофагов [74], удаляющих фрагменты поврежденных клеток, а хемокин IP-10 – еще и натуральных киллеров [75]. Вовлечению NK-клеток во врожденный иммунный ответ способствует и то обстоятельство, что клетки СМ при травме экспрессируют паттерны повреждения, в частности, стресс-индуцированные молекулы (MICA, MICB), служащие лигандами для рецепторов NKG2D [76], высокий уровень экспрессии которых натураль-

ными киллерами показан при травме спинного мозга [60]. Проявления цитотоксической активности НК-клеток, направленные при ТСМ на нервную ткань, на первый взгляд, значительно усугубляют деструктивные процессы при травме [60]. Однако участие натуральных киллеров в элиминации только тех клеток, что несут паттерны повреждения, способствует более быстрому устранению деструктивных явлений в очаге поражения СМ.

Исследование другого важного «игрока» – макрофагов – в условиях тканевого повреждения показало, что их активация происходит в два этапа: на первом этапе эти клетки под влиянием эндогенных молекул, высвобождаемых в процессе клеточного повреждения, приобретают воспалительный (M1) фенотип, на более поздних этапах, когда реакция на повреждение переходит в стадию репаративных процессов, активированные макрофаги поляризуются в резидентный (M2) фенотип [77]. В связи с этим можно предполагать, что в острую фазу ТСМ будут формироваться преимущественно макрофаги фенотипа M1, индукции которого способствуют, в частности, интерфероны [78], накапливающиеся, как уже сообщалось, в поврежденных тканях при травме спинного мозга [59]. Эти макрофаги секретируют характерные для данного фенотипа IL-12, IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-23, IL-21, TNF- α , iNOS, высокий уровень которых зарегистрирован при данной патологии [67, 69, 77].

Функции этих цитокинов неравнозначны. IL-12 способствует дальнейшему запуску адаптивных клеточных реакций; IL-10 обладает иммуносупрессорным действием и участвует в индукции регуляторных Т-клеток; IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23, TNF- α обеспечивают провоспалительный эффект; TNF- α и индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS) провоцируют реакции клеточного повреждения [78, 79].

Преобладающий цитокиновый профиль, а также присутствие продуцентов макрофагов M1 в сочетании с воздействием аутоантигенов поврежденного СМ позволяют предположить, что в состав популяции Т-лимфоцитов, участвующих в иммунном ответе на начальном этапе иммунного процесса, входят клетки Th17, функциональное значение которых в острый период ТСМ в настоящее время доказано. Дело в том, что функциональная роль этой субпопуляции тесно связана с формированием баланса Т-хелперы-17/регуляторные Т-клетки (Th17/Treg). В своей работе Q. Fu и соавт. [29] описывают эти процессы следующим образом. Баланс клеток Th17/Treg регулируется соответственно молекулами, ROR γ T и FoxP3, при этом экспрессия FoxP3 может быть ингибирована экспрессией ROR γ T. Как показано выше, ТСМ сопровождается миграцией макрофагов M1 в очаг поражения и выделением провоспалительных

цитокинов, в том числе IL-6 и IL-21, что позволяет Т-хелперам (CD4+ Т-лимфоцитам) дифференцироваться именно в направлении CD4+IL-17A+ Th17, которые способствуют развитию воспалительной реакции путем вовлечения в процесс нейтрофильных гранулоцитов. В сочетании с провоспалительными цитокинами, продуцируемыми в очаге поражения макрофагами, нейронами, клетками нейроглии, продукты Th17 и нейтрофилов в значительной степени усиливают воспалительные явления, что расценивается исследователями как весьма нежелательный компонент патогенеза посттравматических изменений в СМ.

Следует также подчеркнуть, что индукция Th17 на начальном этапе требует еще одного цитокина – трансформирующего фактора роста β (TGF β), основным продуцентом которого являются Treg. Эти клетки, как составная часть баланса Th17/Treg, формируются преимущественно под влиянием IL-10, также продуцируемым макрофагами M1 в относительно небольшом количестве на начальном этапе тканевого повреждения. IL-10, как и TGF β , обладает еще и иммуносупрессорными свойствами, несколько ограничивая избыточность воспалительного процесса аутоиммунной природы при травме спинного мозга [77, 80].

Таким образом, реакции врожденного иммунитета и Т-клеточные реакции, преобладающие в острую фазу ТСМ, следует оценивать неравнозначно. С одной стороны, они направлены на деструкцию клеток в поврежденной ткани СМ либо через их апоптоз, либо через цитолиз, а также индукцию воспалительных реакций, усиливающих неврологическую дисфункцию. С другой стороны, эти реакции способствуют удалению разрушенных клеточных элементов вместе с присущими им аутоантигенами, паттернами повреждения, медиаторами воспаления, а также включают механизмы контроля воспалительных реакций. Эти выводы не позволяют упрощенно подходить к оценке роли иммунных процессов при травме спинного мозга и влияют на тактику лечебных мероприятий в острый период, поскольку требуют оценки не отдельных показателей, а баланса преобладающих в каждой конкретной ситуации иммунных механизмов, имеющих протективную или патогенетическую направленность.

2. ИММУННОЕ И ЦИТОКИНОВОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА НА ЭТАПЕ ХРОНИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ

Травматическое повреждение СМ еще в острую фазу вызывает сильную воспалительную реакцию [81] и столь же мощный иммунный ответ, который реализуется как внутри, так и за пределами повреж-

дения [82], не проявляя склонности к разрешению. Связано это с тем, что в данном случае наблюдается взаимодействие между ЦНС и иммунной системой, т.е. между двумя основными системами, регулирующими гомеостаз во всем организме. По этой причине процесс не ограничивается реакцией клеток иммунной системы в очаге поражения СМ, а распространяется на всю иммунную систему в целом [83].

Функции иммунной системы претерпевают значительные изменения по мере того, как травма переходит из острого состояния в хроническое. Потеря или дисфункция вегетативной иннервации в лимфатических и эндокринных тканях приводит к нарушениям иммунного ответа еще долгое время после первоначальной травмы [84]. Основными проявлениями подобных нарушений служат иммунная депрессия и аутоиммунный процесс [83], хотя воспалительные реакции в полной мере сохраняют свое патогенетическое значение.

Так, начиная с 7 дня после нанесения ТСМ и далее регистрировались признаки процесса восстановления миелиновой оболочки нейронов на фоне биохимически регистрируемой активности олигодендроглии с продукцией провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6 [85]. При этом отмечено, что чем выше уровень провоспалительных цитокинов в хроническую фазу, тем быстрее наступает период ремиссии после ТСМ [86].

Дело в том, что именно провоспалительные цитокины служат сигналом активации для астроцитов глиальной ткани СМ [87]. Астроциты подвергаются пролиферации и приобретают один из двух фенотипов. Астроциты одного фенотипа активно продуцируют глиально-фибрилярный кислый белок (GFAP), который способствует восстановлению нейронов, тогда как астроциты другого фенотипа, наоборот, секретируют глутаминсинтазу, которая участвует в накоплении глутамата, что тормозит восстановление нейронов в пораженном участке спинного мозга. Баланс астроцитов двух фенотипов и определяет эффективность репаративных процессов в нейрональной ткани [88]. Нейроны продуцируют нейрегулин-1 (Nrg-1), который стимулирует восстановление клеток, способствует сохранению белого вещества спинного мозга, позитивно регулирует функции макрофагов, Т-лимфоцитов, В-клеток и в настоящее время рекомендуется даже в качестве лечебного препарата при ТСМ [89].

Несмотря на возможность такой положительной регуляции, следует учитывать, что все описанные события происходят в ЦНС и поэтому могут иметь не только местные, но и системные проявления.

Системные изменения на уровне клеточных популяций и субпопуляций лимфоцитов в хрониче-

скую стадию ТСМ затрагивают, прежде всего, Т-клеточные адаптивные иммунные реакции. Так, показано снижение общего числа Т-лимфоцитов (CD3+) и субпопуляции Т-хелперов (CD3+ CD4+) в крови, хотя число активированных CD4+ Т-клеток (HLA-DR+CD4+) оставалось повышенным [90]. Такой вариант возможен, например, если снижение числа Т-хелперов в крови происходит вследствие их миграции в орган поражения.

Особый интерес в этой ситуации представляют регуляторные Т-клетки (Treg) с их супрессорными свойствами, которые характеризуются фенотипом CD3+CD4+CD25+CD127lo при преобладании активированной фракции CCR4+HLA-Dr+. Значительно повышается при ТСМ и уровень основного цитокина этих клеток – трансформирующего фактора роста β (TGF β), что во многом объясняет наблюдаемую иммунную дисфункцию и ее последствия в виде снижения защиты от инфекций и/или персистенции хронического воспаления [5, 38].

Дефицит Т-клеточного звена иммунного ответа на системном уровне сопровождается и значительным снижением числа NK-клеток в хроническую фазу ТСМ, что, в конечном итоге, нередко проявляется развитием инфекционных процессов с летальным исходом [91].

Что касается одного из основных механизмов индукции наблюдаемых сдвигов, то можно привести следующие данные С.С. Ferrante и S.J. Leibovich [77], которые отметили, что после острой фазы тканевого повреждения фенотип макрофагов резко изменился с M1 на M2, который значительно отличается по продукции цитокинов от типичных клеток M2. Эта разновидность названа ангиогенным M2d-фенотипом. Основными продуктами секреции макрофагов M2d были фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и IL-10, индуцирующий образование регуляторных Т-клеток, – отсюда и преобладание ангиогенных и иммуносупрессорных эффектов (см. рис. 3). Аналогичные преобразования касались и макрофагальных клеток микроглии [92].

Особого внимания заслуживают аутоиммунные процессы, ассоциированные с ТСМ. D.P. Ankeny и соавт. [93] показали, что травма спинного мозга и сопутствующая ей иммунодепрессия вызывают глубокие и длительные изменения функций В-клеток в периферической лимфоидной ткани (костный мозг и селезенка) и поврежденном спинном мозге. В частности, активированные В-клетки приобретают способность после дифференцировки продуцировать аутоантитела, которые связывают белки ЦНС и ядерные антигены, включая ДНК и РНК. Известно, что при системной красной волчанке, анти-ДНК-антитела перекрестно реагируют с рецепторами к глутамату,

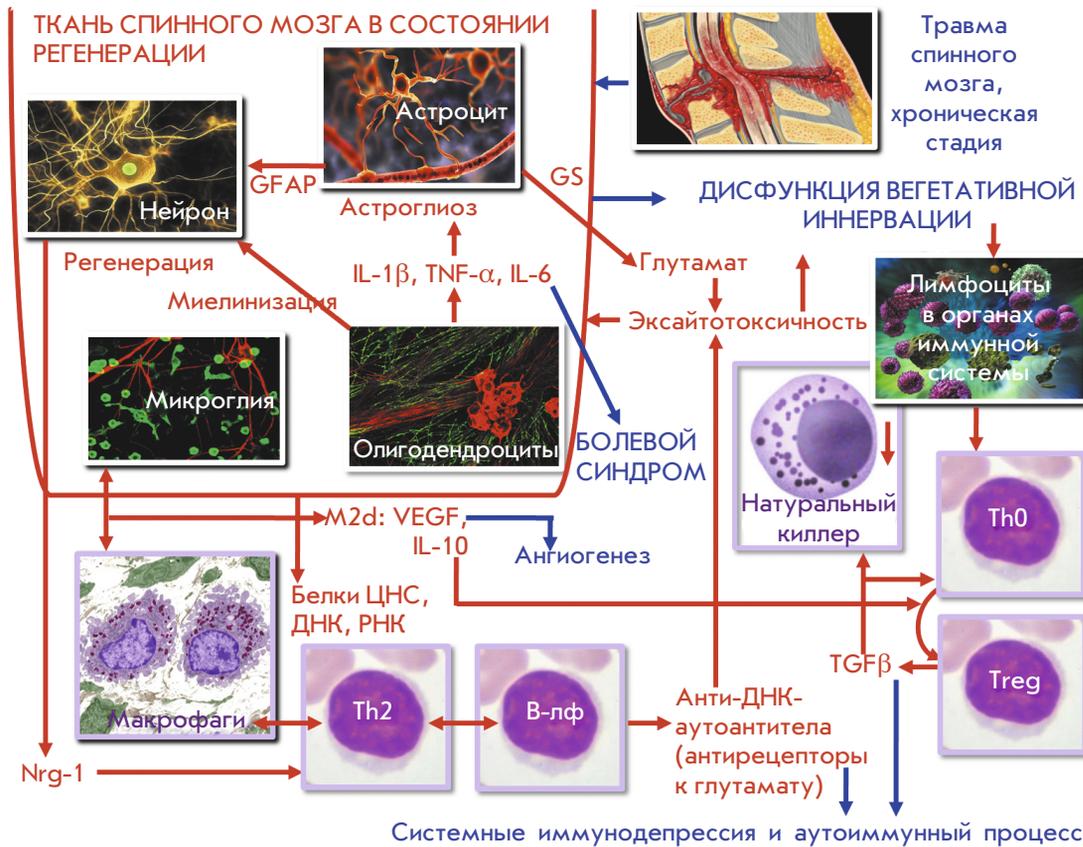


Рис. 3. Иммунопатогенетические особенности хронической стадии травмы спинного мозга

вызывая эксайтотоксичность [94]. Аналогичный эффект оказывают и аутоантитела, продуцируемые после ТСМ и обладающие сходными свойствами нейротоксичности.

При травме спинного мозга аутоиммунитет может также способствовать восстановлению ЦНС и/или нейропротекции, несмотря на тенденцию к проявлению нейротоксичности. Подобное нейропротекторное действие в модели ТСМ у крыс проявляют миелинреактивные Т-клетки [95]. Противоречивость данных о роли аутоантител связана со способностью антител против белков ЦНС способствовать регенерации аксонов и ремиелинизации [96], а также и процессам демиелинизации, вследствие возможности формирования с участием антимиелиновых антител своеобразного «мостика» между миелином нервных волокон и олигодендроцитами [97]. Во всяком случае, несмотря на неоднозначность эффектов и их трактовок, факт инфильтрации пораженного спинного мозга В-лимфоцитами в хроническую фазу считается подтвержденным [93].

Представленный анализ показывает, что сложность интерпретации результатов проистекает из того, что совокупность местных и системных эффектов при ТСМ довольно трудно дифференцировать. С этой

точки зрения определенную перспективу открывает возможность разграничения местных и системных проявлений иммунных реакций. Например, значительные изменения цитокинового профиля при ТСМ, особенно в хронический период, наблюдались не только в крови. Еще более информативными изменениями цитокинового профиля были в ликворе. Так А.Р. Taylor и соавт. [98] в качестве критериев интенсивности хронического воспаления определяли уровни IL-2, -6, -7, -8, -10, -15, -18, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), интерферона-γ (IFNγ), хемоаттрактанта кератиноцитов (КС-подобного белка), IFNγ-индуцируемого белка-10 (IP-10), моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1) и фактора некроза опухоли α (TNF-α) в спинномозговой жидкости. Концентрация большинства цитокинов и хемокинов в ликворе животных с ТСМ коррелировала с длительностью поражения, показателями тяжести травмы на момент взятия пробы и неврологическим исходом в отдаленный период после получения травмы. Например, концентрация IL-8 при травме спинного мозга была значимо выше, чем в здоровом контроле, но отрицательно коррелировала с длительностью травмы, а концентрации колониестимулирующих факторов и MCP-1 были отрица-

тельно связаны с позитивным исходом в отдаленный период после травмы.

Отдельного внимания заслуживает роль фактора некроза опухолей α в хроническую фазу травмы спинного мозга. Дело в том, что в этот период снижается содержание нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) в гиппокампе и возрастает в латеральной части спинного мозга. Делеция гена рецептора к TNF- α отменяет этот эффект, но в присутствии данного цитокина эффект восстанавливается. Полученные данные позволили предположить, что различные структурные синаптические изменения в нейронах спинного мозга и гиппокампа опосредованы перепроизводством TNF- α активированными клетками микроглии, что при травме спинного мозга может быть связано с развитием хронической нейропатической боли и дефицита памяти [99].

К развитию нейропатической боли причастен и IL-1 β , снижающий эффективность работы кальциевого насоса в нейронах [100].

Таким образом, цитокины играют довольно значительную роль в патогенезе травматической болезни, связанной с повреждением спинного мозга, и определяют многие ее проявления. При этом источником секретируемых цитокинов могут быть клетки иммунной системы, но основными продуцентами этих биологически активных веществ служат нейроны поврежденного спинного мозга. В связи с этим цитокиновый профиль при ТСМ имеет особое диагностическое и прогностическое значение и характеризует не только состояние иммунной системы при данной патологии, но и неврологический статус.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обзор публикаций, посвященных проблеме иммунного, в том числе цитокинового, сопровождения ТСМ, показывает неоднозначность имеющихся сведений и определенную трудность их трактовки.

Сложность проблемы связана, в первую очередь, с тем, что и нервная, и иммунная системы выполняют в организме важнейшие регуляторные функции и тесно связаны между собой при высоком разнообразии механизмов такой взаимосвязи. При этом предполагаются как местные, так и системные эффекты, сопровождающие изменения неврологического и иммунного характера при травме спинного мозга.

Помимо этих общих позиций, необходимо учитывать поэтапность местных и системных изменений в центральной нервной системе и иммунных процессах, ассоциированных с ТСМ [101, 102]. На каждом из этих этапов преобладает свой патогенетический механизм, который сначала связан с реакцией на повреждение и направлен на устранение поврежденных клеток, затем акцент перемещается в сторону воспалительных реакций с их функцией ограничения очага поражения. Наконец, на поздних этапах происходит переход от местных реакций к системным процессам, эффективность которых и определяет исход патологического процесса. Каждому этапу сопутствует своя категория реакций со стороны иммунной системы, маркерами которых могут служить как различные субпопуляции клеток, характеризующих врожденный и адаптивный иммунный ответ, так и секреторные продукты этих клеток – цитокины [103, 104].

Особенность цитокинов как маркеров патологических изменений при ТСМ заключается в том, что они продуцируются не только клетками иммунной системы, но и клетками пораженного спинного мозга. На модели цитокинового профиля в наибольшей степени можно проследить процесс взаимодействия нервной и иммунной систем, что представляет не только теоретический интерес, но и имеет важное диагностическое значение, позволяет наметить основные мишени терапевтических воздействий. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karsy M., Hawryluk G. // *Neurosurg. Clin. N. Am.* 2017. V. 28. № 1. P. 49–62.
2. La Placa M.C., Simon C.M., Prado G.R., Cullen D.K. // *Prog. Brain Res.* 2007. V. 161. P. 13–26.
3. Bracken M.B. // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012. V. 1. CD001046.
4. Minakov A.N., Chernov A.S., Asutin D.S., Konovalov N.A., Telegin G.B. // *Acta Nature.* 2018. V. 10. № 3. P. 4–10.
5. Monahan R., Stein A., Gibbs K., Bank M., Bloom O. // *Immunol. Res.* 2015. V. 63. № 1–3. P. 3–10.
6. Oyinbo C.A. // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)*. 2011. V. 71. № 2. P. 281–299.
7. Zhang N., Yin Y., Xu S.J., Wu Y.P., Chen W.S. // *Indian J. Med. Res.* 2012. V. 135. № 3. P. 287–296.
8. Wilcox J.T., Satkunendrarajah K., Nasirzadeh Y., Laliberte A.M., Lip A., Cadotte D.W., Foltz W.D., Fehling M.G. // *Neurobiol. Dis.* 2017. V. 105. P. 194–212.
9. Cruz C.D., Coelho A., Antunes-Lopes T., Cruz F. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015. V. 82–83. P. 153–159.
10. Figley S.A., Khosravi R., Legasto J.M., Tseng Y.-F., Fehlings M.G. // *J. Neurotrauma.* 2014. V. 31. № 6. P. 541–552.
11. Kunis G., Baruch K., Rosenzweig N., Kertser A., Miller O., Berkutzki T., Schwartz M. // *Brain.* 2013. V. 136. № 11. P. 3427–3440.
12. Li Y., Lucas-Osma A.M., Black S., Bandet M.V., Stephens M.J., Vavrek R., Sanelli L., Fenrich K.K., Di Narzo A.F., Dracheva S., et al. // *Nat. Med.* 2017. V. 23. № 6. P. 733–741.
13. Shechter R., Miller O., Yovel O.G., Rosenzweig N., London A., Ruckh J., Kim K.-W., Klein E., Kalchenko V., Bendel P., et al. //

- Immunity. 2013. V. 38. № 3. P. 555–569.
14. Jorge A., Taylor T., Agarwal N., Hamilton D.K. // *World Neurosurg.* 2019. V. 132. P. 138–147.
 15. Breckwoldt M.O., Pfister F.M., Bradley P.M., Marinković P., Williams P.R., Brill M.S., Plomer B., Schmalz A., St Clair D.K., Naumann R., et al. // *Nat. Med.* 2014. V. 20. № 5. P. 555–560.
 16. Ouardouz M., Coderre E., Basak A., Chen A., Zamponi G.W., Hameed S., Rehak R., Yin X., Trapp B.D., Stys P.K. // *Ann. Neurol.* 2009. V. 65. № 2. P. 151–159.
 17. Yin H.Z., Hsu C.I., Yu S., Rao S.D., Sorkin L.S., Weiss J.H. // *Exp. Neurol.* 2012. V. 238. № 2. P. 93–102.
 18. Khayrullina G., Bermudez S., Byrnes K.R. // *J. Neuroinflammation.* 2015. V. 12. P. 172–182.
 19. von Leden R.E., Khayrullina G., Moritz K.E., Byrnes K.R. // *J. Neuroinflammation.* 2017. V. 14. № 1. P. 161–174.
 20. Goss J.R., Taffe K.M., Kochanek P.M., DeKosky S.T. // *Exp. Neurol.* 1997. V. 146. № 1. P. 291–294.
 21. Ren H., Chen X., Tian M., Zhou J., Ouyang H., Zhang Z. // *Adv. Sci.* 2018. V. 5. № 11. P. 1800529.
 22. Sutherland T.C., Mathews K.J., Mao Y., Nguyen T., Gorrie C.A. // *Front. Cell Neurosci.* 2017. V. 10. P. 310.
 23. Shohami E., Bass R., Wallach D., Yamin A., Gallily R. // *J. Cereb. Blood Metabol.* 1996. V. 16. № 3. P. 378–384.
 24. Yu W.R., Fehlings M.G. // *Acta Neuropathol.* 2011. V. 122. № 6. P. 747–761.
 25. Chen S., Ye J., Chen X., Shi J., Wu W., Lin W., Lin W., Li Y., Fu H., Li S. // *J. Neuroinflammation.* 2018. V. 15. № 1. P. 150–163.
 26. Deng G., Gao Y., Cen Z., He J., Cao B., Zeng G., Zong S. // *Cell Biochem.* 2018. V. 50. № 2. P. 512–524.
 27. He J., Zhao J., Peng X., Shi X., Zong S., Zeng G. // *Cell Physiol. Biochem.* 2017. V. 44. № 3. P. 1224–1241.
 28. Бейлерли О.А., Азизова Ш.Т., Коновалов Н.А., Ахмедов А.Д., Гареев И.Ф., Белогуров А.А. // *Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко.* 2020. Т. 84. № 4. С. 104–110.
 29. Fu Q., Liu Y., Liu X., Zhang Q., Chen L., Peng J., Ao J., Li Y., Wang S., Song G., et al. // *Am. J. Transl. Res.* 2017. V. 9. № 9. P. 3950–3966.
 30. Cao Y., Wu T.D., Wu H., Lang Y., Li D.Z., Ni S.F., Lu H.B., Hu J.Z. // *Brain Res.* 2017. V. 1655. P. 55–65.
 31. Ujigo S., Kamei N., Hadoush H., Fujioka Y., Miyaki S., Nakasa T., Tanaka N., Nakanishi K., Eguchi A., Sunagawa T., et al. // *Spine.* 2014. V. 39. № 14. P. 1099–1107.
 32. Pineau I., Lacroix S. // *J. Comp. Neurol.* 2007. V. 500. № 2. P. 267–285.
 33. Yang L., Blumbergs P.C., Jones N.R., Manavis J., Sarvestani G.T., Ghabriel M.N. // *Spine.* 2004. V. 29. № 9. P. 966–971.
 34. Yang L., Jones N.R., Blumbergs P.C., van den Heuvel C., Moore E.J., Manavis J., Sarvestani G.T., Ghabriel M.N. // *J. Clin. Neurosci.* 2005. V. 12. № 3. P. 276–284.
 35. Saiwai H., Ohkawa Y., Yamada H., Kumamaru H., Harada A., Okano H., Yokomizo T., Iwamoto Y., Okada S. // *Am. J. Pathol.* 2010. V. 176. № 5. P. 2352–2366.
 36. Yokota K., Saito T., Kobayakawa K., Kubota K., Hara M., Murata M., Ohkawa Y., Iwamoto Y., Okada S. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 25673–25684.
 37. Ankeny D.P., Guan Z., Popovich P.G. // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119. № 10. P. 2990–2999.
 38. Beck K.D., Nguyen H.X., Galvan M.D., Salazar D.L., Woodruff T.M., Anderson A.J. // *Brain.* 2010. V. 133. Pt. 2. P. 433–447.
 39. Raposo C., Graubardt N., Cohen M., Eitan C., London A., Berkutzki T., Schwartz M. // *J. Neurosci.* 2014. V. 34. № 31. P. 10141–10155.
 40. Saiwai H., Kumamaru H., Ohkawa Y., Kubota K., Kobayakawa K., Yamada H., Yokomizo T., Iwamoto Y., Okada S. // *J. Neurochem.* 2013. V. 125. № 1. P. 74–88.
 41. Kumamaru H., Saiwai H., Ohkawa Y., Yamada H., Iwamoto Y., Okada S. // *J. Cell Physiol.* 2012. V. 227. № 4. P. 1335–1346.
 42. Nguyen D.H., Cho N., Satkunendrarajah K., Austin J.W., Wang J., Fehlings M.G. // *J. Neuroinflammation.* 2012. V. 9. P. 224–237.
 43. Min K.J., Jeong H.K., Kim B., Hwang D.H., Shin H.Y., Nguyen A.T., Kim J.H., Jou I., Kim B.G., Joe E.H. // *J. Neuroinflammation.* 2012. V. 9. P. 100–112.
 44. Smith P.D., Puskas F., Meng X., Lee J.H., Cleveland J.C. Jr., Weyant M.J., Fullerton D.A., Reece T.B. // *Circulation.* 2012. V. 126. № 11(1). P. 110–117.
 45. Zhu P., Li J.X., Fujino M., Zhuang J., Li X.K. // *Mediators Inflamm.* 2013. V. 2013. P. 701970.
 46. Akhmetzyanova E., Kletenkov K., Mukhamedshina Y., Rizvanov A. // *Front. Syst. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 37–48.
 47. Chu G.K., Yu W., Fehlings M.G. // *Neuroscience.* 2007. V. 148. № 3. P. 668–682.
 48. Floriddia E.M., Rathore K.I., Tedeschi A., Quadrato G., Wuttke A., Lueckmann J.M., Kigerl K.A., Popovich P.G., Di Giovanni S. // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 40. P. 13956–13970.
 49. Horn K.P., Busch S.A., Hawthorne A.L., van Rooijen N., Silver J. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 38. P. 9330–9341.
 50. Azam S., Jakaria M., Kim I.S., Kim J., Haque M.E., Choi D.K. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 1000.
 51. Kigerl K.A., Popovich P.G. // *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2009. V. 336. P. 121–136.
 52. Hug H., Mohajeri M.H., La Fata G. // *Nutrients.* 2018. V. 10. № 2. P. 203.
 53. Kawasaki T., Kawai T. // *Front. Immunol.* 2014. V. 5. P. 461.
 54. Marinelli C., Di Liddo R., Facci L., Bertalot T., Conconi M.T., Zusso M., Skaper S.D., Giusti P. // *J. Neuroinflammation.* 2015. V. 12. P. 244.
 55. Trudler D., Farfara D., Frenkel D. // *Mediators Inflamm.* 2010. V. 2010. P. 497987.
 56. Lacagnina M.J., Watkins L.R., Grace P.M. // *Pharmacol. Ther.* 2018. V. 184. P. 145–158.
 57. Heiman A., Pallottie A., Heary R.F., Elkabes S. // *Brain Behav. Immun.* 2014. V. 42. P. 232–245.
 58. Lobenwein D., Tepekoylu C., Kozarin R. // *J. Am. Heart. Assoc.* 2015. V. 4. № 10. e002440.
 59. Roselli F., Chandrasekar A., Morganti-Kossmann M.C. // *Front. Neurol.* 2018. V. 9. P. 458.
 60. Wang Y.Y., Shen D., Zhao L.J., Zeng N., Hu T.H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. V. 517. № 4. P. 741–748.
 61. Laginha I., Kopp M.A., Druschel C., Schaser K.D., Brommer B., Hellmann R.C., Watzlawick R., Ossami-Saidi R.R., Prüss H., Failli V., et al. // *BMC Neurol.* 2016. V. 16. № 1. P. 170.
 62. Xu L., Zhang Y., Zhang R., Zhang H., Song P., Ma T., Li Y., Wang X., Hou X., Li Q., et al. // *Int. Immunopharmacol.* 2019. V. 74. P. 105722.
 63. Rust R., Kaiser J. // *J. Neurosci.* 2017. V. 37. № 18. P. 4658–4660.
 64. Mittal A., Sagi V., Gupta M., Gupta K. // *Front. Cell Neurosci.* 2019. V. 13. P. 110–115.
 65. Vanganswinkel T., Geurts N., Quanten K., Nelissen S., Lemmens S., Geboes L., Dooley D., Vidal P.M., Pejler G., Hendrix S. // *FASEB J.* 2016. V. 30. № 5. P. 2040–2057.
 66. Nelissen S., Vanganswinkel T., Geurts N., Geboes L., Lemmens E., Vidal P.M., Lemmens S., Willems L., Boato F.,

- Dooley D., et al // *Neurobiol. Dis.* 2014. V. 62. P. 260–272.
67. Hong J., Chang A., Zavvarian M.M., Wang J., Liu Y., Fehlings M.G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 8. P. 2167–2178.
68. Hong J., Chang A., Liu Y., Wang J., Fehlings M.G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 15. P. 3762.
69. Yuan X., Wu Q., Tang Y., Jing Y., Li Z., Xiu R. // *Life Sci.* 2019. V. 221. P. 47–55.
70. Rutz S., Ouyang W. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 941. P. 89–116.
71. Rutz S., Ouyang W. // *Curr. Opin. Immunol.* 2011. V. 23. № 5. P. 605–612.
72. Lobo-Silva D., Carriche G.M., Castro A.G., Roque S., Saraiva M. // *J. Neuroinflammation.* 2016. V. 13. № 1. P. 297.
73. Цибулькина В.Н., Цибулькин Н.А. // *Аллергология и иммунология в педиатрии.* 2017. № 2 (49). С. 4–11.
74. Сарбаева Н.Н., Пономарева Ю.В., Милякова М.Н. // *Гены и клетки.* 2016. Т. XI. № 1. С. 9–17.
75. Zhang Y., Gao Z., Wang D., Zhang T., Sun B., Mu L., Wang J., Liu Y., Kong Q., Liu X., et al. // *J. Neuroinflammation.* 2014. V. 11. P. 79.
76. Балмасова И.П., Шмелева Е.В., Еремина О.Ф., Дунда Н.И. // *Аллергология и иммунология.* 2009. Т. 10. № 2. С. 169.
77. Ferrante C.J., Leibovich S.J. // *Adv. Wound Care (New Rochelle).* 2012. V. 1. № 1. P. 10–16.
78. Балмасова И.П., Нестерова И.В., Малова Е.С., Сепиашвили Р.И. Структурно-функциональная организация иммунной системы. М.: Практическая медицина, 2019. 72 с.
79. Чубенко В.А. // *Практическая онкология.* 2016. Т. 17. № 2. С. 99–109.
80. Fasching P., Stradner M., Graninger W., Dejaco C., Fessler J. // *Molecules.* 2017. V. 22. № 1. P. 134.
81. Rice T., Larsen J., Rivest S., Yong V.W. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2007. V. 66. № 3. P. 184–195.
82. Irwin M.R., Cole S.W. // *Nat. Rev. Immunol.* 2011. V. 11. № 9. P. 625–632.
83. Schwab J.M., Zhang Y., Kopp M.A., Brommer B., Popovich P.G. // *Exp. Neurol.* 2014. V. 258. P. 121–129.
84. Zhou Y., Li N., Zhu L., Lin Y., Cheng H. // *Neuropsychiatr. Dis Treat.* 2018. V. 14. P. 2401–2413.
85. Zhang Y., Guan Z., Reader B., Shawler T., Mandrekari-Colucci S., Huang K., Weil Z., Bratasz A., Wells J., Powell N.D., et al. // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. № 32. P. 12970–12981.
86. Moghaddam A., Child C., Bruckner T., Gerner H.J., Daniel V., Biglari B. // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. № 4. P. 7900–7916.
87. Sanz P., Garcia-Gimeno M.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 11. P. 4096–4112.
88. Pekny M., Pekna M. // *Physiol. Rev.* 2014. V. 94. № 4. P. 1077–1098.
89. Alizadeh A., Santhosh K.T., Kataria H., Gounni A.S., Karimi-Abdolrezaee S. // *J. Neuroinflammation.* 2018. V. 15. № 1. P. 53–73.
90. Monahan R., Stein A., Gibbs K., Bank M., Bloom O. // *Immunol. Res.* 2015. V. 63. № 1–3. P. 3–10.
91. Herman P., Stein A., Gibbs K., Korsunsky I., Gregersen P., Bloom O. // *J. Neurotrauma.* 2018. V. 35. № 15. P. 1819–1829.
92. Gensel J.C., Zhang B. // *Brain Res.* 2015. V. 1619. P. 1–11.
93. Ankeny D.P., Lucin K.M., Sanders V.M., McGaughy V.M., Popovich P.G. // *J. Neurochem.* 2006. V. 99. P. 1073–1087.
94. DeGiorgio L.A., Konstantinov K.N., Lee S.C., Hardin J.A., Volpe B.T., Diamond B. // *Nat. Med.* 2001. V. 7. № 11. P. 1189–1193.
95. Hauben E., Butovsky O., Nevo U., Yoless E., Moalem G., Agranov E., Mor F., Leibowitz-Amit R., Pevsner E., Akselrod S., et al. // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. № 17. P. 6421–6430.
96. Huang D.W., McKerracher L., Braun P.E., David S. // *Neuron.* 1999. V. 24. № 3. P. 639–647.
97. Kotter M.R., Li W.W., Zhao C., Franklin R.J. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 1. P. 328–332.
98. Taylor A.R., Welsh C.J., Young C., Spoor E., Kerwin S.C., Griffin J.F., Levine G.J., Cohen N.D., Levine J.M. // *J. Neurotrauma.* 2014. V. 31. № 18. P. 1561–1569.
99. Liu Y., Zhou L.J., Wang J., Li D., Ren W.J., Peng J., Wei X., Xu T., Xin W.J., Pang R.P., et al. // *J. Neurosci.* 2017. V. 37. № 4. P. 871–881.
100. Mirabelli E., Ni L., Li L., Acioglu C., Heary R.F., Elkabes S. // *J. Neuroinflammation.* 2019. V. 16. № 1. P. 207.
101. Bradbury E.J., Burnside E.R. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 3879.
102. Telegin G.B., Minakov A.N., Chernov A.S., Manskikh V.N., Asyutin D.S., Konovalov N.A., Gabibov A.G. // *Acta Naturae.* 2019. V. 11. № 3(42). P. 75–81.
103. Сергеева С.П., Ерофеева Л.М., Гультияев М.М., Балмасова И.П. // *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* 2010. № 3. С. 27–31.
104. Белогууров А.А., Иванова О.М., Ломакин Я.А., Зиганшин Р.Х., Васькина М.И., Кнорре В.Д., Климова Е.А., Габибов А.Г., Иванов В.Т., Говорун В.М. // *Биохимия.* 2016. Т. 81. № 11. С. 1540–1552.

УДК 577.33

Цианиновые красители, активируемые в ближнем инфракрасном диапазоне, как агенты для фототермической терапии и диагностики опухолевых новообразований

Е. И. Шрамова^{1*}, А. Б. Котляр², Е. Н. Лебедеко¹, С. М. Деев^{1,3}, Г. М. Прошкина¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Тель-Авивский университет, Тель-Авив, 69978 Израиль

³Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, 634050 Россия

*E-mail: shramova.e.i@gmail.com

Поступила в редакцию 28.05.2020

Принята к печати 24.07.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11028

РЕФЕРАТ Инновационные методы лечения, включающие одновременную диагностику и терапию, особенно востребованы в современной онкомедицине. Развитие наномедицины предлагает новые решения, позволяющие повысить терапевтический индекс и минимизировать побочные эффекты. Так, разработка фотоактивируемых красителей, способных к трансформации энергии поглощенного света в излучение при более высоких длинах волн (флуоресценция) и в тепло, привела к возникновению фототераностики – направления, объединяющего биоимиджинг глубоких опухолей и метастазов с одновременным их устранением посредством термического воздействия. Создание активируемых ближним ИК-светом (700–900 нм) агентов для чувствительного флуоресцентного биоимиджинга и фототерапии является приоритетной задачей фототераностики, поскольку свет в ближнем ИК-диапазоне глубоко проникает в ткани и характеризуется низким уровнем автофлуоресценции. В настоящем обзоре рассмотрены красители, поглощающие свет в ближнем ИК-диапазоне, обсуждена перспективность их использования для фототермической терапии и диагностики онкологических заболеваний. Особое внимание уделено рассмотрению новых многофункциональных нанолатформ для фототераностики, позволяющих достичь синергического эффекта, сочетая фототермическую и/или фотодинамическую терапию с флуоресцентной, акустической и/или магнитно-резонансной визуализацией.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ближний ИК-диапазон, фототермическая терапия, цианины.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ICG – indocyanine green (краситель индоцианиновый зеленый); PEG – polyethylene glycol (полиэтиленгликоль); PEI – polyethyleneimine (полиэтиленимин); PLGA – poly(lactic-co-glycolic acid) (полилактидгликолид); RTX – raclitaxel (наклитаксел); АНЧ – апконвертирующие наночастицы; АФК – активные формы кислорода; БР – краситель бенгальский розовый; БСА – бычий сывороточный альбумин; ИК – инфракрасный; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФТТ – фототермическая терапия; ЧСА – человеческий сывороточный альбумин.

ВВЕДЕНИЕ

Фототерапия онкологических образований с использованием органических соединений ведет свою историю с 1972 г., когда И. Диамонд с коллегами в опытах на крысах показали принципиальную возможность использования гематопорфирина в качестве мощного фототерапевтического агента для избирательно-го уничтожения клеток глиомы [1]. С того времени

было разработано большое количество органических соединений для фототерапии на основе порфирина, цианина и полимерных красителей, часть из которых используется в клинике [2, 3].

Настоящий обзор посвящен применению органических красителей, возбуждаемых инфракрасным (ИК)-светом, в качестве агентов для фототермической терапии и диагностики опухолевых новообра-

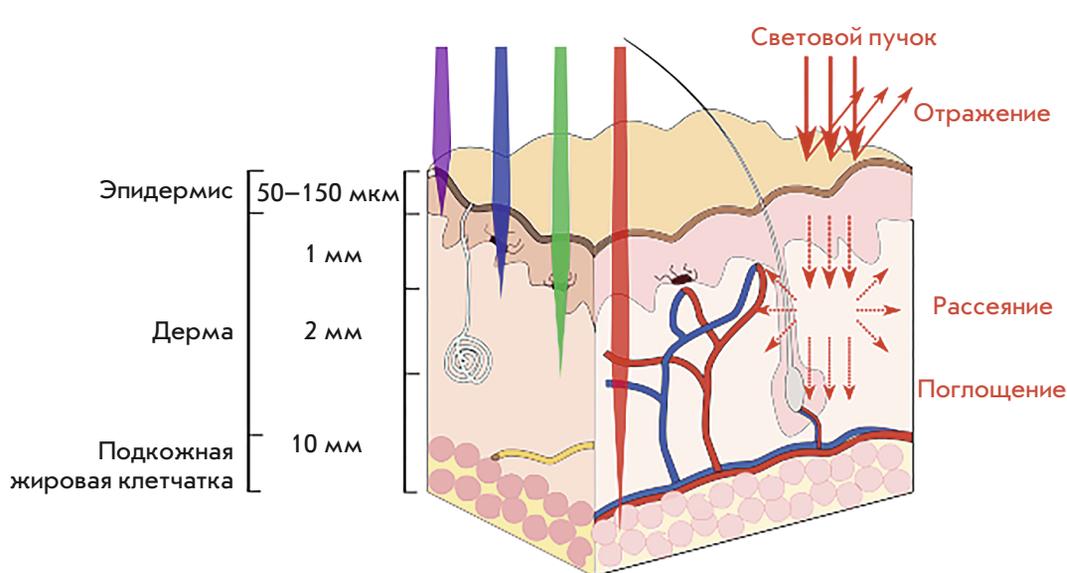


Рис. 1. Глубина проникновения света в ткани человека

зований. Теоретические аспекты фототерапии и физико-химические свойства агентов, используемых в фототерапии, подробно описаны в обзорах [4–7].

В основе фототерапии лежит селективное уничтожение опухолевых клеток под воздействием света. Красители поглощают свет и трансформируют его энергию в тепло, тем самым вызывая повреждение и гибель клеток. Фототерапия с использованием красителей включает в себя фотодинамическую (ФДТ) и фототермическую терапию (ФТТ). В случае ФДТ [7] свет индуцирует химические реакции, продукты которых оказывают негативное воздействие на жизнедеятельность клеток. В случае же ФТТ [8] краситель непосредственно трансформирует энергию света в тепло, вызывая термические повреждения клеток.

Из-за интенсивного поглощения квантов видимого и ультрафиолетового света биологическими тканями (рис. 1) метод фототерапии с использованием света в указанном диапазоне применяется в клинической практике только для терапии поверхностных опухолей, доступных для внешних источников света. Известно, что в ультрафиолетовой области спектра эффективно поглощают белки, нуклеиновые кислоты, витамины и большинство кофакторов, в видимой области спектра (400–650 нм) интенсивно поглощают оксигемоглобин, дезоксигемоглобин и меланин. Поэтому предпочтительным волновым диапазоном возбуждения в медицине («окно прозрачности») является ближний ИК-свет в диапазоне 700–900 нм [4]. Использование света в диапазоне от 900 до 1100 нм не представляется возможным из-за сильного поглощения воды (рис. 2).

Фототерапия имеет несколько очевидных преимуществ, таких, как неинвазивность, возможность

воздействовать на ткани, находящиеся глубоко в организме, локальность и точность облучения, регулирование степени воздействия на опухоль посредством изменения дозы облучения. В дополнение к этим преимуществам при использовании ближнего ИК-света для фототерапии возбуждающий свет глубоко проникает в биологические ткани и вызывает меньшую фоновую флуоресценцию, также для фотоагентов, активируемых ИК-светом, характерна крайне редкая активация видимым светом.

За последние годы фототерапия достигла значительных успехов благодаря использованию лазеров в качестве источников света, нанобъектов для доставки сенсibilizаторов [10–13], использованию красителей направленного действия [14, 15], увеличению времени циркуляции красителей в крови

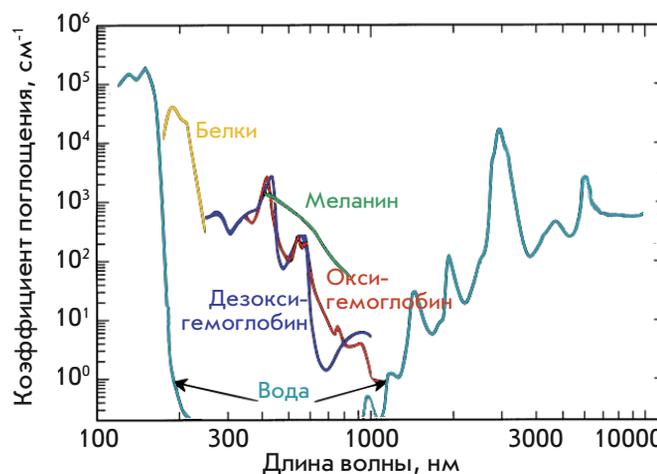


Рис. 2. Спектры поглощения биотканей в видимой и инфракрасной областях (адаптировано из [9])

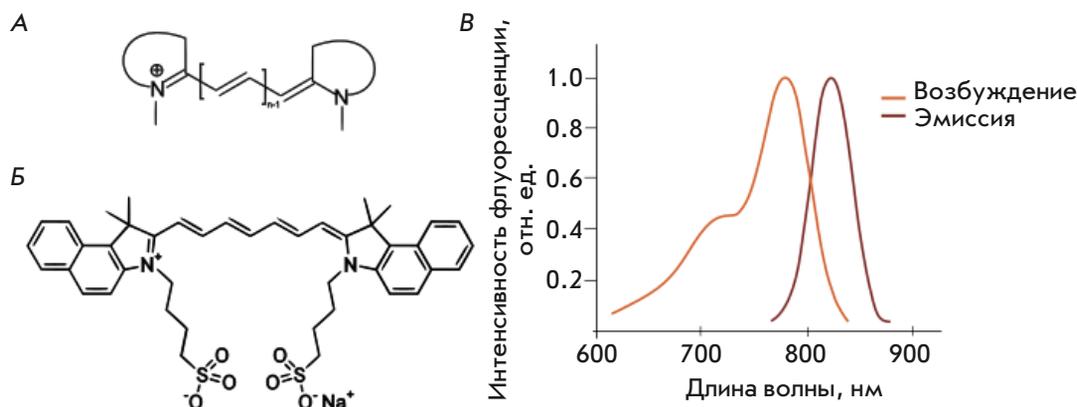


Рис. 3. Структура и оптические свойства цианиновых красителей. Общая структура цианиновых красителей (А), структура индоцианинового зеленого (ICG) (Б), спектры возбуждения и эмиссии ICG (В)

[16], замедленному высвобождению красителей [17]. Также показано, что конъюгация красителей с иммуноадьювантами перспективна в фотоиммунотерапии, поскольку приводит к индукции системного иммунного ответа [18].

Хорошо известно, что гипоксия является отличительной особенностью солидных опухолей [19]. Именно поэтому для фототерапии таких опухолей целесообразно использовать вещества, действующие не фотодинамически, а фототермически.

На сегодняшний день ФТТ является клинически одобренным методом, применяемым при лечении пациентов с солидными опухолями печени, почек, легких, надпочечников, предстательной железы и костей [20]. Повышение температуры опухоли до 42°C делает раковые клетки более восприимчивыми к традиционным методам лечения (лучевая и химиотерапия), поскольку с повышением температуры увеличивается проницаемость биологических мембран, ускоряются эндоцитоз и кровообращение [21]. Повышение температуры ткани до 45°C и выше приводит к некрозу опухолевых клеток [22].

В последнее время с помощью нанотехнологий активно разрабатываются фототермические сенсibiliзирующие агенты, такие, как наночастицы золота [23], золотые наностержни [10], апконвертирующие наночастицы [14, 24–28], углеродные нанотрубки, графен и его производные и многие другие [8].

В биомедицинском имиджинге и фототерапии особое место среди фотоактивируемых агентов занимают органические красители в силу своих разносторонних фотофизических свойств и простоты крупномасштабного синтеза. Органические красители могут быть конъюгированы с различными специфическими биомолекулами, что расширяет круг их применения для терапии. Недостаток большинства красителей в их нестабильности и быстром выведении из кровотока.

Фототермические агенты должны обладать несколькими основными свойствами, такими, как: 1) сильное поглощение света в ближнем ИК-диапазоне (значение коэффициентов экстинкции $> 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); 2) биосовместимость и биоразлагаемость; 3) визуализация в режиме реального времени для контроля терапии [29]. Этими свойствами в полной мере обладают получившие широкое распространение для фототерапии опухолей красители на основе цианина. Цианины – синтетические органические красители (рис. 3А), которые возбуждаются светом в инфракрасном диапазоне (780–820 нм) и отлично подходят для флуоресцентного имиджинга и фототерапии.

ИНДОЦИАНИНОВЫЙ ЗЕЛЕНЫЙ И НАНОСИСТЕМЫ ДЛЯ ЕГО ДОСТАВКИ

Индоцианиновый зеленый (ICG) (рис. 3Б, В) представляет собой карбоцианиновый краситель, широко используемый в медицинской диагностике [30]. Спектральные характеристики данного красителя позволяют использовать его в качестве контрастного вещества для оптической визуализации в ангиографии [31, 32], биопсии сторожевых лимфоузлов при раке молочной железы [33], для оценки объема плазмы крови после сердечно-сосудистых операций [34, 35] и оценки функциональных резервов печени в гепатологии [36]. Отметим, что ICG является одним из наименее токсичных контрастирующих веществ, разрешенных к применению в медицинской практике [37]. Единственная известная побочная реакция на ICG – анафилактический шок в редких случаях [38]. Под действием ИК-лазера ($\lambda = 808 \text{ нм}$, мощность потока 155 Вт/см^2) большую часть энергии возбуждающего света ICG преобразует в тепло и через 30 с облучения вызывает локальный нагрев ткани до 75°C [39]. При этом часть энергии тратится на выработку синглетного кислорода, что позволяет использовать

его для комбинированной фототермической (ФТТ) и фотодинамической терапии (ФДТ) [40].

Было показано, что при интратуморальном введении ICG хорошо накапливается в опухолевых тканях и сторожевых лимфоузлах [41]. В опытах *in vitro* показано, что под действием облучения ICG индуцирует гибель клеток плоскоклеточного рака [42], рака толстой кишки [43], рака поджелудочной железы человека [44].

ICG обладает низким квантовым выходом флуоресценции [45, 46], подвержен фотообесцвечиванию, что ограничивает его использование для продолжительного биоимиджинга *in vivo* [39, 47, 48]. Многие исследователи отмечали, что в водной среде происходит окисление и димеризация молекул ICG, что приводит к снижению поглощения возбуждающего света, уменьшению флуоресценции и изменению максимума длины волны поглощения [30, 49, 50–55]. Кроме того, при системном введении ICG не способен специфически накапливаться в опухолях, поскольку быстро связывается альбумином плазмы крови и быстро выводится из организма (2–4 мин) [49, 52, 56].

Для увеличения времени циркуляции ICG в организме разработаны различные системы наночастиц. Так, на сегодняшний день созданы наночастицы с включенным ICG на основе полимерных комплексов [57, 58], пептидов [59], белков [60–62], мицелл [63, 64], магнитных [65] и полилактидгликолидных (PLGA) частиц [66]. За счет инкапсулирования красителя в PLGA-частицы удалось улучшить стабильность ICG в воде и повысить его термостабильность [66]. Восьмичасовая инкубация PLGA-частиц в физиологических условиях приводила к утечке 78% красителя. Чтобы преодолеть эту проблему, были разработаны композитные микрокапсулы из кремнеземного полимера. Это привело к сокращению утечки ICG до 17% [39], однако потребовало увеличения размера частиц до 1 мкм. Кроме того, оказалось, что полимерные оболочки практически не защищают инкапсулированные молекулы красителя от димеризации или фотоизомеризации, о чем свидетельствует смещение длины волны пика поглощения в более длинноволновую область [39, 67, 68] и значительное снижение интенсивности пика флуоресценции [66]. Улучшить свойства инкапсулированных молекул ICG удалось при использовании в качестве носителей органически модифицированных силикатов [69], однако и в этом случае размеры полученных частиц были недостаточно малы и составляли около 100 нм, что соответствует верхней границе диапазона размеров носителей, применяющихся в экспериментах *in vivo* [70].

В ряде работ в качестве носителей ICG для терапии и биоимиджинга предложено использовать

биodeградируемые наночастицы фосфата кальция [71–73]. Средний размер таких частиц в суспензии составляет около 16 нм, а функционализация внешней поверхности частиц карбоксилатом или полиэтиленгликолем (PEG) приводила к сохранению стабильности частиц в физиологических растворах в течение длительного времени и одновременному сохранению высокого квантового выхода и фотостабильности красителя. Показано, что при внутривенном введении частицы, покрытые PEG и нагруженные ICG, благодаря эффекту повышенной проницаемости капилляров и нарушенного лимфатического дренажа в опухолевой ткани, накапливаются в ксенотрансплантированных опухолях модельных животных, при этом краситель детектируется *in vivo* в течение четырех дней после его введения. При этом поверхность нагруженных наночастиц может быть функционализирована адресными антителами для усиления направленного накопления частиц в опухоли, что продемонстрировано на опухолях молочной железы посредством нацеливания на трансферриновый рецептор CD71 [72], на клетках рака поджелудочной железы нацеливанием на рецептор гастрина [72], на клетках лейкоза нацеливанием на рецепторную тирозинкиназу CD117 и трансмембранный гликопротеин первого типа CD96 [73].

Комплексы ICG с полиэтиленимином (PEI), включенные в наночастицы на основе диоксида кремния [74], обладали улучшенными фотофизическими свойствами по сравнению с самим красителем. Взаимодействие с PEI приводило к предотвращению агрегации ICG и тушению флуоресценции красителя и практически предотвращало вытекание красителя из частиц. Использование комплекса ICG-PEI в сочетании с кремниевыми наночастицами позволило детектировать ИК-сигналы при биоимиджинге на глубине до 2 см от поверхности тела. Взаимодействие ICG с белками приводит к изменению параметров флуоресценции красителя для создания адресных ИК-зондов. После связывания с рецепторами и интернализации краситель диссоциировал от антител, что приводило к восстановлению исходных параметров флуоресценции красителя. Созданы адресные зонды на основе комплексов ICG с даклизумабом, трастузумабом или панитумумабом, взаимодействующими соответственно с рецепторами интерлейкина-2 (CD25), рецепторами II и I эпидермального фактора роста человека (HER2 и HER1) [75].

Адресная доставка ICG в клетки в составе липидных наночастиц, функционализированных молекулами фолиевой кислоты (*рис. 4А*), является альтернативным методом адресной доставки красителя в клетки [76]. Установлено, что эти биосовместимые

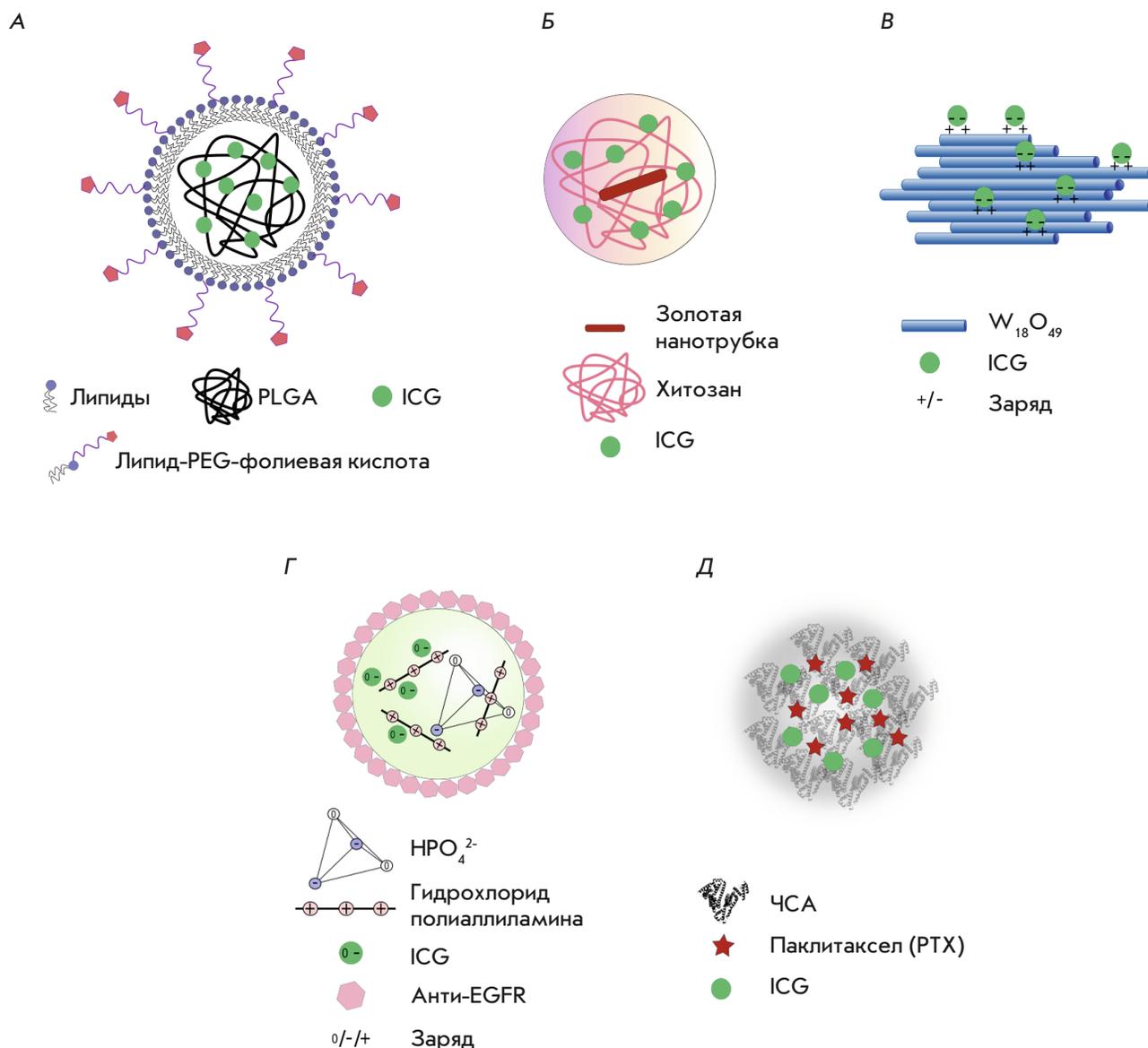


Рис. 4. Наносистемы для доставки индоцианинового зеленого ICG в опухолевые клетки. **А** – липидные наночастицы, нагруженные ICG и функционализированные молекулами фолиевой кислоты по внешней поверхности [76]; **Б** – наносферы хитозана с инкапсулированными золотыми нанотрубками и ICG [77]; **В** – наностержни оксида вольфрама со связанными на поверхности молекулами ICG [78]; **Г** – наносферы гидрохлорида полиаллиламина и солей ортофосфорной кислоты, нагруженные ICG и функционализированные антителами к рецептору эпидермального фактора роста человека (EGFR) [57]; **Д** – наночастицы, состоящие из ICG, человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и паклитаксела (PTX) [79]

частицы обладают хорошей монодисперсностью, сохраняют фотостабильность и характеризуются более продолжительным временем циркуляции в кровотоке по сравнению со свободным ICG. Эксперименты *in vivo* подтвердили адресное накопление описанных частиц в опухоли, что делает липидные наночастицы идеальными агентами для прижизненного биоимиджинга и ранней онкодиагностики.

Для двухмодальной фототерапии, сочетающей в себе одновременно ФТТ и ФДТ, была предложена наноплатформа на основе гибридных наносфер хитозана, инкапсулированных в них золотых стержней и ICG (рис. 4Б) [77]. Гибридные наносферы имели диаметр 180 нм и поглощали в диапазоне от 650 до 900 нм. ICG внутри наносфер защищен от быстрого гидролиза в биологических жидкостях, что увели-

чивает время жизни красителя и эффективность его действия на клетки. Двухмодальная фототерапия показала высокий синергический эффект и улучшила терапевтическую эффективность отдельно взятых ICG и золотых наностержней. Так, при облучении ИК-лазером модельных животных, которым предварительно ввели наносферы, у мышей опытной группы объем опухоли увеличился всего в 16 раз, тогда как у мышей контрольной группы – в 58 раз.

Для двухмодальной фототерапии можно также использовать наностержни оксида вольфрама ($W_{18}O_{49}$) и ICG [78]. В этой конструкции наностержни оксида вольфрама одновременно выступают в роли эффективного фототермического агента для ФТТ и в роли наноносителя, электростатически связывающего на своей поверхности молекулы ICG (рис. 4В). Как и в случае с золотыми наностержнями, при двухмодальной терапии, запускаемой облучением наностержней оксида вольфрама, наблюдается повышенная летальность клеток HeLa по сравнению с мономодальной терапией (только ФТТ или ФДТ). Эксперименты на животных показали, что вольфрамовые наностержни со связанными молекулами красителя эффективно разрушают солидные опухоли при облучении светом (808 нм), демонстрируя таким образом высокий потенциал этих нанокомпозитов в терапии опухолей.

Описано применение ICG сферических композитных капсул, состоящих из молекул гидрохлорида полиаллиламина и солей ортофосфорной кислоты (рис. 4Г) для ФТТ [57]. Поверхность капсул была функционализирована антителами к рецептору эпидермального фактора роста человека (EGFR) для нацеливания на EGFR-положительные раковые клетки. В опытах *in vitro* при облучении клеток ИК-лазером (808 нм) при интенсивности облучения в 6 Вт/см² наблюдалась почти 100% гибель клеток, обработанных анти-EGFR-нанокапсулами, нагруженными ICG, в то время как смертность клеток, обработанных свободным красителем, составила лишь 15%.

Разработана нанотераностическая платформа для ФТТ и биоимиджинга, состоящая из трех клинически одобренных препаратов: сывороточного альбумина человека (ЧСА), паклитаксела (РТХ) и ICG (рис. 4Д) [79]. Показано, что смешивание молекул ЧСА, РТХ и ICG приводит к образованию стабильных наночастиц размером 80 нм. В этой системе ЧСА играет роль биосовместимого носителя, РТХ – эффективного противоопухолевого лекарственного средства, а ICG выступает одновременно и в качестве зонда для флуоресцентной визуализации, и в качестве фототермического агента. Показано, что эти трехкомпонентные наночастицы (ЧСА–ICG–РТХ) имеют более высокую стабильность и более длитель-

ное время жизни в кровотоке, чем комплекс ЧСА–ICG. Умеренный фототермический нагрев, вызываемый ICG под воздействием ИК-лазера, способствует увеличению внутриклеточного поглощения ЧСА–ICG–РТХ, что усиливает цитотоксичность комплекса. В опытах *in vivo* с использованием прижизненного биоимиджинга показано, что нанокомплексы эффективно накапливаются в первичной опухоли и в метастазах легких. В случае подкожных опухолей и метастазов терапия трехкомпонентными наночастицами дает отличный синергический эффект, основанный на химическом и фототермическом воздействии. Описанная тераностическая наноплатформа, состоящая из клинически одобренных агентов, обладает высоким потенциалом как для неинвазивного выявления очага заболевания, так и для терапии онкологических заболеваний.

Таргетные липосомные частицы, нагруженные красителем и функционализированные по поверхности фолиевой кислотой [80], успешно использовались для подавления клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, сверхэкспрессирующих на поверхности рецепторы фолиевой кислоты. Показано, что эти липосомные частицы эффективны при ФТТ *in vitro* и *in vivo*.

АНАЛОГИ КРАСИТЕЛЯ ИНДОЦИАНИНОВОГО ЗЕЛЕННОГО С УЛУЧШЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ

В современных исследованиях наряду с ICG используют ряд аналогов красителя, характеризующиеся улучшенными фотооптическими свойствами и повышенной стабильностью в биологических средах [81, 82] (таблица, рис. 5).

Красители IR780, IR783, IR800, IR808 с успехом применены для биоимиджинга [86, 93–96]. Обнаружено, что водорастворимые красители IR780, IR783, IR808 предпочтительно накапливаются в опухолевых клетках *in vitro* и *in vivo*. Однако, как и ICG, они быстро выводятся из кровотока и отличаются непродолжительным удержанием в опухоли, что ограничивает временное окно для проведения фототерапии [97].

IRDye800CW (IR800) – водорастворимый аналог ICG, одобрен для клинического применения и используется для биомедицинского имиджинга и флуоресцентной хирургии – методе, включающем использование флуоресцентного контрастного вещества для улучшения интраоперационной визуализации опухоли [96, 98]. Конъюгаты IR800 с различными антителами, нацеленными на факторы роста и протеогликаны, успешно использовали в доклинических и клинических испытаниях для фототераностики опухолей мозга [96, 99–101], молочной железы [102] и рака головы и шеи [103–105].

ОБЗОРЫ

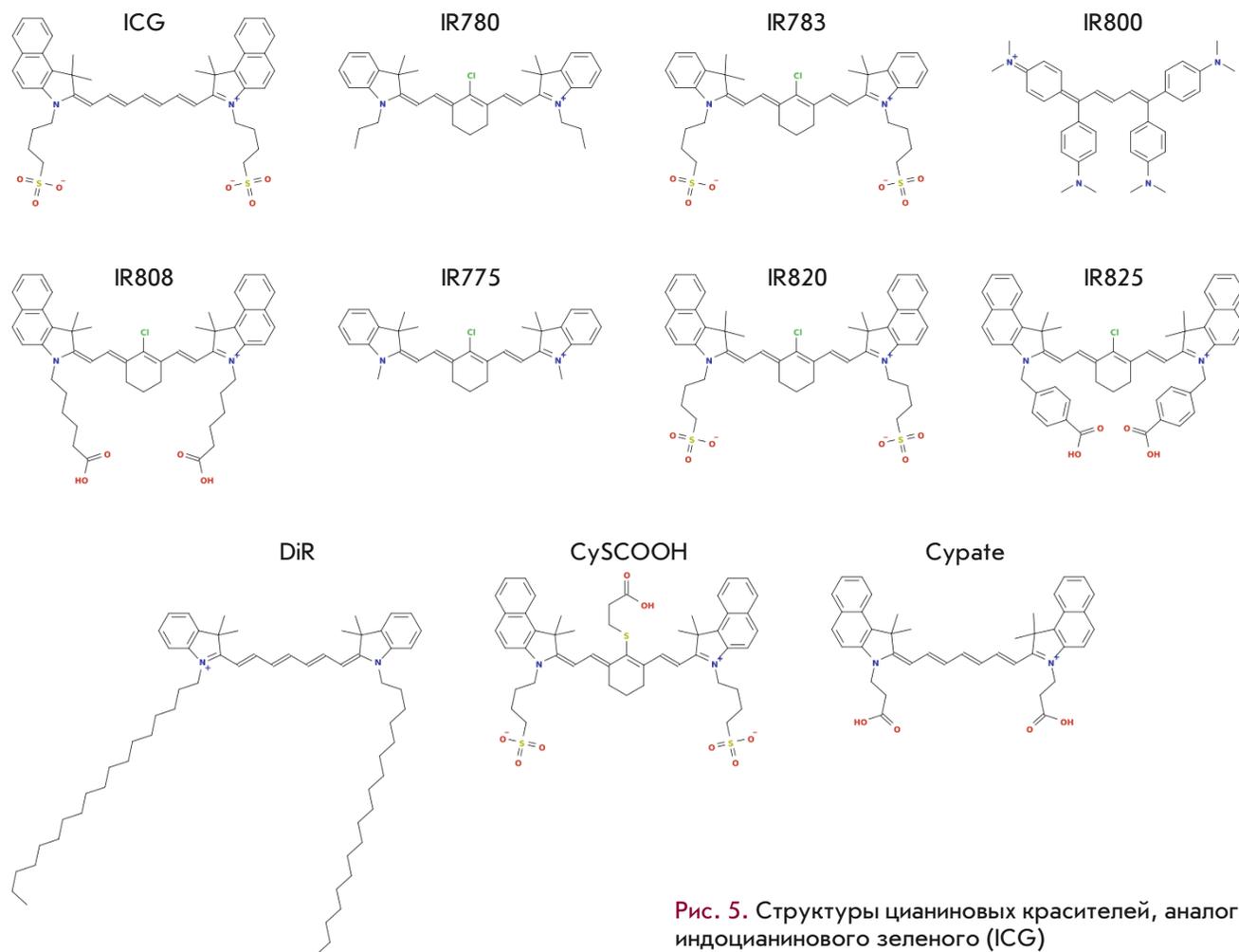


Рис. 5. Структуры цианиновых красителей, аналогов индоцианинового зеленого (ICG)

Основные фотофизические свойства ICG и его аналогов, активируемых в ИК-диапазоне

№	ИК-краситель	Поглощение λ_{\max} , нм	Эмиссия λ_{\max} , нм	Коэффициент экстинкции, ϵ , ($\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Квантовый выход синглетного кислорода, %*	Квантовый выход флуоресценции, %	Ссылка
1	ICG	785	822	2.04	0.8	7.8 ^M	[82]
2	IR780	780	798–823**	2.65	12.7	0.07–0.17%**	[83, 84]
3	IR783	783	804	1.17	3	4	[82]
4	IR800	774	794	2.40	н/д	9	[85]
5	IR808	783 ^M	816	3.00	н/д	5.9	[86, 87]
6	IR775	775 ^M	792	2.37	н/д	7	[88]
7	IR820	820	850	2.02	2	4.4	[82]
8	IR825	825 ^M	-	1.14	н/д	<0.1 ^M	[89]
9	DiR	747 ^M	774 ^M	2.70	н/д	28	[90]
10	CySCOON	820	840	н/д	н/д	н/д	[91]
11	Cypate	785	822	2.16	2	6.5	[92]

*Относительно бенгальского розового [82]; **в зависимости от растворителя.
н/д – нет данных; M – в метаноле.

Использование высокоэффективных гидрофобных аналогов ICG потребовало разработки систем доставки красителей к очагу заболевания на основе наночастиц различной природы [106, 107]. Так, в 2017 г. [108] была разработана фототераностическая наноплатформа для бимодальной терапии (ФДТ и ФТТ) в сочетании с биоимиджингом в режиме реального времени на основе гидрофобного аналога ICG, IR775. Водорастворимый IR775 с целью его доставки в опухоли был загружен в биосовместимые полимерные наночастицы размером 40 нм на основе PEG и поликапролактона. Инкапсулированный в наночастицы IR775 вызывает разогрев тестируемой жидкости до 55°C и генерирует выработку активных форм кислорода под действием облучения. В опытах *in vivo* показано, что инкапсулированный в наночастицы IR775 после системного введения эффективно накапливается в раковых опухолях, дает четкий флуоресцентный сигнал при ИК-облучении и приводит к полному уничтожению опухоли, устойчивой к традиционной химиотерапии, после всего лишь однократного сеанса комбинаторной фототерапии.

Для мультимодальной ФТТ с одновременной флуоресцентной и фотоакустической визуализацией разработана тераностическая наноплатформа на основе наночастиц ферритина, нагруженных IR820, названная «хамелеон» [62]. В спектре поглощения свободного IR820 присутствует минорный пик на длине волны 550 нм. При возбуждении как свободного красителя, так и в составе частиц источником света с длиной волны 550 нм наблюдается эмиссия с максимумом при 604 нм. Возбуждение красителя на длине волны основного пика поглощения (770 нм) приводило к эмиссии с максимумом при 834 нм. Это свойство IR820 позволило использовать возбуждение наночастиц на длине волны 550 нм для флуоресцентной визуализации, а возбуждение ИК-лазером на 808 нм для фотоакустической визуализации и высокоэффективной ФТТ. После внутривенной инъекции наночастиц модельным животным и последующего ИК-облучения с низкой интенсивностью (0.5 Вт/см²) отмечали полное исчезновение опухолей без выраженной токсичности и рецидивов.

В комбинированной терапии используются также и апконвертирующие наночастицы (АНЧ) (рис. 6А). Для увеличения растворимости и стабильности в физиологических жидкостях АНЧ были покрыты бычьим сывороточным альбумином (БСА). При этом непосредственно в белковую шубу комплекса БСА с АНЧ были интегрированы два красителя – бенгальский розовый (БР), поглощающий свет на длине волны 560 нм, и IR825, поглощающий свет при 808 нм [109]. При возбуждении лазером на длине волны 980 нм АНЧ переизлучают свет в зеленой области

спектра, возбуждая тем самым БР, который, генерируя АФК, оказывает фотодинамический эффект. Краситель IR825 возбуждается лазером на длине волны 808 нм, генерируя тепло. Синергический эффект разработанной бимодальной системы доказан в опытах *in vitro* и *in vivo*.

На основе мицелл, нагруженных красителем IR780 и радиоактивным изотопом рения-188 (¹⁸⁸Re), разработана многофункциональная платформа для ФТТ, флуоресцентной визуализации и однофотонной эмиссионной томографии [110]. Данная платформа позволяет отслеживать накопление и распределение мицелл в опухоли, а также кинетику высвобождения нагруженных в мицеллы препаратов в режиме реального времени. В опытах *in vivo* при проведении ФТТ на модельных животных с ксенографтными опухолями (рак прямой кишки) удалось добиться торможения роста опухолей у животных опытной группы на 82.6%. Гистопатологический анализ выявил необратимые повреждения тканей некротического характера, снижение пролиферативной активности, усиление апоптоза клеток и увеличение экспрессии белков теплового шока в опухолях, подверженных ФТТ.

Показано [58], что водорастворимые наночастицы на основе гепарина и фолиевой кислоты (рис. 6Б) способны связывать водонерастворимый краситель, IR780. Нерастворимые в воде молекулы фолиевой кислоты формируют гидрофобное ядро с включенным IR780 в центре частицы, молекулы же гепарина – гидрофильный слой на поверхности частицы. Небольшая часть молекул фолиевой кислоты находится на поверхности частицы, формируя адрес для нацеливания на опухолевые клетки, экспрессирующие рецептор фолата. Эти частицы показывают хорошую монодисперсность, высокую стабильность и специфичность в отношении фолат-положительных клеток MCF-7. Опыты *in vivo* показали, что частицы на основе фолиевой кислоты и гепарина вызывают не только фототермический эффект при облучении, но и служат инструментом для визуализации опухолевого очага.

Еще один йодированный аналог ICG – DiR (йодид 1,1-диооктадецил-3,3,3,3-тетраметилдотрикарбоцианина), поглощающий при 808 нм, был использован для визуализации в ИК-диапазоне и одновременной фототермической абляции опухолей и метастазов рака молочной железы [64]. Краситель пассивно доставляется к очагам воспаления в составе полимерных наночастиц. DiR обладает как фототермическими, так и фотодинамическими свойствами: при введении красителя непосредственно в опухоль и последующем облучении происходит разрушение раковых клеток за счет одно-

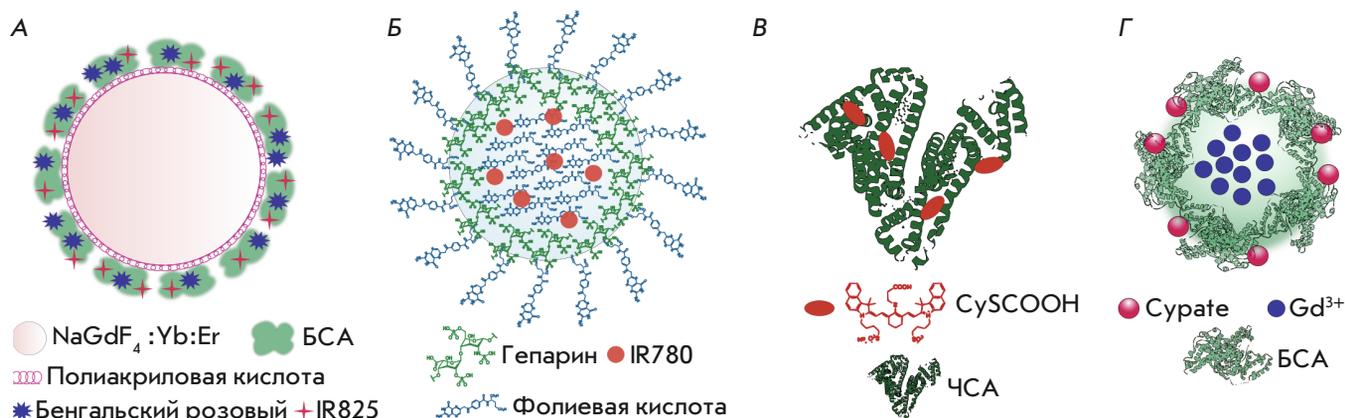


Рис. 6. Многофункциональные платформы на основе аналогов красителя индоцианинового зеленого (ICG) для фототераностики. А – апконвертирующие наночастицы с БСА, в глобулу которого интегрированы бенгальский розовый и IR825 [109]; Б – наночастицы на основе гепарина и фолиевой кислоты, нагруженные IR780 [58]; В – конъюгаты человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и Cy5COOH [91]; Г – наночастицы гадолиния, покрытые конъюгатом БСА-Cypate [113]

временной генерации красителем тепла и активных форм кислорода [111].

Цианиновый краситель Cy5COOH, полученный путем введения жесткого циклогексенильного кольца в гептаметиновую цепь ICG (таблица и рис. 5) и конъюгированный с ЧСА (рис. 6В), показал улучшенное накопление и более продолжительное удержание в опухоли по сравнению со свободным красителем Cy5COOH. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что он может применяться для фотоакустической визуализации, ИК-флуоресцентного биоимиджинга и термической терапии [91]. В опытах *in vivo* полная фототермическая абляция опухоли достигалась при однократном внутривенном введении препарата с последующим ИК-облучением (808 нм, 1 Вт/см², 5 мин).

Карбоцианиновый краситель Cypate – еще один краситель цианиновой группы, который поглощает в ближней ИК-области (~800 нм, таблица) и проявляет при облучении фотоакустический и фототермический эффекты [81, 112]. Для доставки этого красителя использовали наночастицы гадолиния, покрытые белковой оболочкой (рис. 6Г) [113]. Молекулы красителя присоединялись к белковой оболочке ковалентно с помощью карбодиимидной реакции. В опытах *in vivo* показано, что полученные наночастицы отлично визуализируют опухолевый очаг методами фотоакустического, магнитно-резонансного и флуоресцентного имиджинга, пассивно накапливаются в клетках опухоли и вызывают полную фототермическую абляцию опухоли после одного сеанса фототерапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фототермическая терапия опухолевых новообразований на основе органических красителей с возбуждением светом в ближней инфракрасной области представляет собой активно развивающееся и перспективное направление биомедицины. Благодаря относительно низкой (по сравнению с другими фототермическими агентами) стоимости используемых красителей, их способности к пассивному накоплению в опухолях, возможности их включения в широкий спектр наноносителей для активной доставки, в том числе таргетной, а также благодаря минимальной инвазивности лечения и незначительным побочным эффектам по сравнению с фототермическими агентами неорганической природы органические красители в последнее время все больше и больше привлекают внимание исследователей. Для улучшения биосовместимости и усиления фототермических свойств индоцианиновых красителей, наряду с созданием новых модификаций красителей, ведется разработка новых способов их доставки на основе наноагентов.

Способность фотоактивируемых красителей к мультимодальному имиджингу, например, одновременной ИК-флуоресценции и фотоакустической визуализации, делает их предпочтительными агентами для фототераностики онкологических заболеваний. Точкой роста в данной области исследований является разработка многофункциональных наноплатформ, сочетающих в себе способность при облучении не только флуоресцировать, но и проявлять фототермические и/или фотодинамические свой-

ства. Описанные в обзоре мультимодальные наноплатформы позволяют не только проводить терапию с сочетанием различных терапевтических подходов, приводящих к впечатляющим синергическим эффектам, но и одновременно визуализировать очаги заболевания, а также осуществлять неинвазивный мониторинг отклика на лечение.

Особое внимание исследователей вызывает разработка таргетных препаратов, позволяющих минимизировать нежелательное токсическое воздействие и побочные эффекты онкотерапии. В настоящее время это направление стремительно развивается не только на основе использования традиционных антител, но и новых адресных скаффолдов неиммуноглобулиновой природы (аффибо-

ди, антикаллинов, белков с анкириновыми повторами и т.д.).

По мнению авторов, разработка подобного рода мультимодальных тераностических наноплатформ будет находиться на переднем крае экспериментальной онкологии, позволяя решать сложнейшие задачи неинвазивной диагностики, высокоэффективного прецизионного лечения, а также мониторинга результативности проводимой терапии в режиме реального времени. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-54-06001 «Разработка новых технологий для специфического уничтожения раковых клеток и опухолей».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Diamond I., McDonagh Antony F., Wilson Charles B., Granelli Steven G., Nielsen S., Jaenicke R. // *Lancet*. 1972. V. 300. № 7788. P. 1175–1177.
- Lucky S.S., Soo K.C., Zhang Y. // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. № 4. P. 1990–2042.
- Zhang P., Hu C., Ran W., Meng J., Yin Q., Li Y. // *Theranostics*. 2016. V. 6. № 7. P. 948–968.
- Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., Kiesslich T. // *Lasers Med. Sci.* 2009. V. 24. № 2. P. 259–268.
- Wilson B.C., Patterson M.S. // *Phys. Med. Biol.* 2008. V. 53. № 9. P. R61–R109.
- Fan W., Huang P., Chen X. // *Chem. Soc. Rev.* 2016. V. 45. № 23. P. 6488–6519.
- Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., et al. // *CA. Cancer J. Clin.* 2011. V. 61. № 4. P. 250–281.
- Zhang H., Chen G., Yu B., Cong H. // *Rev. Adv. Mater. Sci.* 2018. V. 53. № 2. P. 131–146.
- Vogel A., Venugopalan V. // *Chem. Rev.* 2003. V. 103. № 2. P. 577–644.
- Proshkina G., Deyev S., Ryabova A., Tavanti F., Menziani M.C., Cohen R., Katrivas L., Kotlyar A. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. V. 11. № 38. P. 34645–34651.
- Shipunova V.O., Zelepukin I.V., Stremovskiy O.A., Nikitin M.P., Care A., Sunna A., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2018. V. 10. № 20. P. 17437–17447.
- Shipunova V.O., Kotelnikova P.A., Aghayeva U.F., Stremovskiy O.A., Novikov I.A., Schulga A.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. // *J. Magn. Magn. Mater.* 2019. V. 469. P. 450–455.
- Belova M.M., Shipunova V.O., Kotelnikova P.A., Babenyshev A.V., Rogozhin E.A., Cherednichenko M.Yu., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2019. V. 11. № 2. P. 47–53.
- Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A.V., Sen' A.V., Ermilov S.A., Vodenev V.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 39. P. 9690–9695.
- Shilova O.N., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2019. V. 11. № 4. P. 42–53.
- Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Shipunova V.O., Babenyshev A.V., Balalaeva I.V., Nikitin P.I., Deyev S.M., Nikitin M.P. // *Nanoscale*. 2019. V. 11. № 4. P. 1636–1646.
- Pekkanen A.M., Dewitt M.R., Rylander M.N. // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2014. V. 10. № 9. P. 1677–1712.
- Chen W.R., Huang Z., Korbelik M., Nordquist R.E., Liu H. // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2006. V. 25. № 1–2. P. 281–292.
- Harris A.L. // *Nat. Rev. Cancer*. 2002. V. 2. № 1. P. 38–47.
- Huang H.-W., Liauh C.-T. // *J. Med. Biol. Eng.* 2012. V. 32. № 1. P. 1.
- Hong G., Wu J.Z., Robinson J.T., Wang H., Zhang B., Dai H. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. № 1. P. 700.
- Hildebrandt B. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002. V. 43. № 1. P. 33–56.
- Deyev S., Proshkina G., Ryabova A., Tavanti F., Menziani M.C., Eidelstein G., Avishai G., Kotlyar A. // *Bioconjug. Chem.* 2017. V. 28. № 10. P. 2569–2574.
- Grebenik E.A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Khaydukov E.V., Mironova K.E., Stremovskiy O.A., Lebedenko E.N., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. № 4. P. 48–53.
- Grebenik E.A., Kostyuk A.B., Deyev S.M. // *Russ. Chem. Rev.* 2016. V. 85. № 12. P. 1277–1296.
- Guryev E.L., Shilyagina N.Y., Kostyuk A.B., Sencha L.M., Balalaeva I.V., Vodenev V.A., Kutova O.M., Lyubeshkin A.V., Yakubovskaya R.I., Pankratov A.A., et al. // *Toxicol. Sci.* 2019. V. 170. № 1. P. 123–132.
- Mironova K.E., Khochenkov D.A., Generalova A.N., Rocheva V.V., Sholina N.V., Nechaev A.V., Semchishen V.A., Deyev S.M., Zvyagin A.V., Khaydukov E.V. // *Nanoscale*. 2017. V. 9. № 39. P. 14921–14928.
- Khaydukov E.V., Mironova K.E., Semchishen V.A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Khochenkov D.A., Stepanova E.V., Lebedev O.I., Zvyagin A.V., Deyev S.M., et al. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 1. P. 35103.
- Melancon M.P., Zhou M., Li C. // *Acc. Chem. Res.* 2011. V. 44. № 10. P. 947–956.
- Landsman M.L., Kwant G., Mook G.A., Zijlstra W.G. // *J. Appl. Physiol.* 1976. V. 40. № 4. P. 575–583.
- Schutt F., Fischer J., Kopitz J., Holz F.G. // *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2002. V. 30. № 2. P. 110–114.
- Benson R.C., Kues H.A. // *Phys. Med. Biol.* 1978. V. 23. № 1. P. 159–163.
- Motomura K., Inaji H., Komoike Y., Kasugai T., Noguchi S., Koyama H. // *Jpn. J. Clin. Oncol.* 1999. V. 29. № 12. P. 604–607.
- Ishihara H., Okawa H., Iwakawa T., Umegaki N., Tsubo T., Matsuki A. // *Anesth. Analg.* 2002. V. 94. № 4. P. 781–786.
- Ott P. // *Pharmacol. Toxicol.* 1998. V. 83. P. 1–48.

36. Sakka S.G. // *J. Clin. Monit. Comput.* 2018. V. 32. № 5. P. 787–796.
37. Frangioni J. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003. V. 7. № 5. P. 626–634.
38. Olsen T.W. // *Arch. Ophthalmol.* 1996. V. 114. № 1. P. 97.
39. Yu J., Yaseen M.A., Anvari B., Wong M.S. // *Chem. Mater.* 2007. V. 19. № 6. P. 1277–1284.
40. Chen W.R., Adams R.L., Higgins A.K., Bartels K.E., Nordquist R.E. // *Cancer Lett.* 1996. V. 98. № 2. P. 169–173.
41. Li X., Beauvoit B., White R., Nioka S., Chance B., Yodh A.G. // *Optical tomography, photon migration, and spectroscopy of tissue and model media: Theory, human studies, and instrumentation* / Eds Chance B., Alfano R.R. SPIE, 1995. V. 2389. P. 789–797.
42. Abels C., Fickweiler S., Weiderer P., Bäuml W., Hofstädter F., Landthaler M., Szeimies R.-M. // *Arch. Dermatol. Res.* 2000. V. 292. № 8. P. 404–411.
43. Bäuml W., Abels C., Karrer S., Weiß T., Messmann H., Landthaler M., Szeimies R.-M. // *Br. J. Cancer.* 1999. V. 80. № 3–4. P. 360–363.
44. Tseng W.W., Saxton R.E., Deganutti A., Liu C.D. // *Pancreas.* 2003. V. 27. № 3. P. e42–e45.
45. Philip R., Penzkofer A., Bäuml W., Szeimies R.M., Abels C. // *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 1996. V. 96. № 1–3. P. 137–148.
46. Soper S.A., Mattingly Q.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1994. V. 116. № 9. P. 3744–3752.
47. Sevic-Muraca E.M., Houston J.P., Gurfinkel M. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002. V. 6. № 5. P. 642–650.
48. Yan J., Estévez M.C., Smith J.E., Wang K., He X., Wang L., Tan W. // *Nano Today.* 2007. V. 2. № 3. P. 44–50.
49. Desmettre T., Devoisselle J.M., Mordon S. // *Surv. Ophthalmol.* 2000. V. 45. № 1. P. 15–27.
50. Gathje J., Steuer R.R., Nicholes K.R. // *J. Appl. Physiol.* 1970. V. 29. № 2. P. 181–185.
51. Holzer W., Mauerer M., Penzkofer A., Szeimies R.-M., Abels C., Landthaler M., Bäuml W. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 1998. V. 47. № 2–3. P. 155–164.
52. Mordon S., Devoisselle J.M., Soulie-Begu S., Desmettre T. // *Microvasc. Res.* 1998. V. 55. № 2. P. 146–152.
53. Maarek J.-M.I., Holschneider D.P., Harimoto J. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2001. V. 65. № 2–3. P. 157–164.
54. Zhang Y., Wang M. // *Mater. Lett.* 2000. V. 42. № 1–2. P. 86–91.
55. Saxena V., Sadoqi M., Shao J. // *J. Pharm. Sci.* 2003. V. 92. № 10. P. 2090–2097.
56. Muckle T.J. // *Biochem. Med.* 1976. V. 15. № 1. P. 17–21.
57. Yu J., Javier D., Yaseen M.A., Nitin N., Richards-Kortum R., Anvari B., Wong M.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 6. P. 1929–1938.
58. Yue C., Liu P., Zheng M., Zhao P., Wang Y., Ma Y., Cai L. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 28. P. 6853–6861.
59. Huang P., Gao Y., Lin J., Hu H., Liao H.-S., Yan X., Tang Y., Jin A., Song J., Niu G., et al. // *ACS Nano.* 2015. V. 9. № 10. P. 9517–9527.
60. Sheng Z., Hu D., Zheng M., Zhao P., Liu H., Gao D., Gong P., Gao G., Zhang P., Ma Y., et al. // *ACS Nano.* 2014. V. 8. № 12. P. 12310–12322.
61. Chen Q., Liang C., Wang X., He J., Li Y., Liu Z. // *Biomaterials.* 2014. V. 35. № 34. P. 9355–9362.
62. Huang P., Rong P., Jin A., Yan X., Zhang M.G., Lin J., Hu H., Wang Z., Yue X., Li W., et al. // *Adv. Mater.* 2014. V. 26. № 37. P. 6401–6408.
63. Zheng M., Yue C., Ma Y., Gong P., Zhao P., Zheng C., Sheng Z., Zhang P., Wang Z., Cai L. // *ACS Nano.* 2013. V. 7. № 3. P. 2056–2067.
64. He X., Bao X., Cao H., Zhang Z., Yin Q., Gu W., Chen L., Yu H., Li Y. // *Adv. Funct. Mater.* 2015. V. 25. № 19. P. 2831–2839.
65. Ma Y., Tong S., Bao G., Gao C., Dai Z. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 31. P. 7706–7714.
66. Saxena V., Sadoqi M., Shao J. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2004. V. 74. № 1. P. 29–38.
67. Gomes A.J., Lunardi L.O., Marchetti J.M., Lunardi C.N., Tedesco A.C. // *Photomed. Laser Surg.* 2006. V. 24. № 4. P. 514–521.
68. Rodriguez V.B., Henry S.M., Hoffman A.S., Stayton P.S., Li X., Pun S.H. // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13. № 1. P. 014025.
69. Kim G., Huang S.-W., Day K.C., O'Donnell M., Agayan R.R., Day M.A., Kopelman R., Ashkenazi S. // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12. № 4. P. 044020.
70. Goldberg M., Langer R., Jia X. // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2007. V. 18. № 3. P. 241–268.
71. Altinoğlu E.I., Russin T.J., Kaiser J.M., Barth B.M., Eklund P.C., Kester M., Adair J.H. // *ACS Nano.* 2008. V. 2. № 10. P. 2075–2084.
72. Barth B.M., Sharma R., Altinoğlu E.İ., Morgan T.T., Shanmugavelandy S.S., Kaiser J.M., McGovern C., Matters G.L., Smith J.P., Kester M., et al. // *ACS Nano.* 2010. V. 4. № 3. P. 1279–1287.
73. Barth B.M., Altinoğlu E., Shanmugavelandy S.S., Kaiser J.M., Crespo-Gonzalez D., DiVittore N.A., McGovern C., Goff T.M., Keasey N.R., Adair J.H., et al. // *ACS Nano.* 2011. V. 5. № 7. P. 5325–5337.
74. Quan B., Choi K., Kim Y.-H., Kang K.W., Chung D.S. // *Talanta.* 2012. V. 99. P. 387–393.
75. Ogawa M., Kosaka N., Choyke P.L., Kobayashi H. // *Cancer Res.* 2009. V. 69. № 4. P. 1268–1272.
76. Zheng C., Zheng M., Gong P., Jia D., Zhang P., Shi B., Sheng Z., Ma Y., Cai L. // *Biomaterials.* 2012. V. 33. № 22. P. 5603–5609.
77. Chen R., Wang X., Yao X., Zheng X., Wang J., Jiang X. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 33. P. 8314–8322.
78. Deng K., Hou Z., Deng X., Yang P., Li C., Lin J. // *Adv. Funct. Mater.* 2015. V. 25. № 47. P. 7280–7290.
79. Chen Q., Liang C., Wang C., Liu Z. // *Adv. Mater.* 2015. V. 27. № 5. P. 903–910.
80. Zheng M., Zhao P., Luo Z., Gong P., Zheng C., Zhang P., Yue C., Gao D., Ma Y., Cai L. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2014. V. 6. № 9. P. 6709–6716.
81. Luo S., Zhang E., Su Y., Cheng T., Shi C. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. № 29. P. 7127–7138.
82. James N.S., Chen Y., Joshi P., Ohulchanskyy T.Y., Ethirajan M., Henary M., Strekowski L., Pandey R.K. // *Theranostics.* 2013. V. 3. № 9. P. 692–702.
83. Singh A.K., Hahn M.A., Gutwein L.G., Rule M.C., Knapik J.A., Moudgil B.M., Grobmyer S.R., Brown S.C. // *Int. J. Nanomedicine.* 2012. V. 7. P. 2739–2750.
84. Alves C.G., Lima-Sousa R., de Melo-Diogo D., Louro R.O., Correia I.J. // *Int. J. Pharm.* 2018. V. 542. № 1–2. P. 164–175.
85. Marshall M.V., Draney D., Sevic-Muraca E.M., Olive D.M. // *Mol. Imaging Biol.* 2010. V. 12. № 6. P. 583–594.
86. Tan X., Luo S., Wang D., Su Y., Cheng T., Shi C. // *Biomaterials.* 2012. V. 33. № 7. P. 2230–2239.
87. Deng G., Li S., Sun Z., Li W., Zhou L., Zhang J., Gong P., Cai L. // *Theranostics.* 2018. V. 8. № 15. P. 4116–4128.
88. Strehmel B., Schmitz C., Kütahya C., Pang Y., Drewitz A., Mustrup H. // *Beilstein J. Org. Chem.* 2020. V. 16. P. 415–444.
89. Cheng L., He W., Gong H., Wang C., Chen Q., Cheng Z., Liu Z. // *Adv. Funct. Mater.* 2013. V. 23. № 47. P. 5893–5902.
90. Texier I., Goutayer M., Da Silva A., Guyon L., Djaker N,

- Josserand V., Neumann E., Bibette J., Vinet F. // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14. № 5. P. 054005.
91. Rong P., Huang P., Liu Z., Lin J., Jin A., Ma Y., Niu G., Yu L., Zeng W., Wang W., et al. // *Nanoscale. Royal Soc. Chem.* 2015. V. 7. № 39. P. 16330–16336.
92. Achilefu S., Dorshow R.B., Bugaj J.E., Rajagopalan R. // *Invest. Radiol.* 2000. V. 35. № 8. P. 479–485.
93. Zhang C., Liu T., Su Y., Luo S., Zhu Y., Tan X., Fan S., Zhang L., Zhou Y., Cheng T., et al. // *Biomaterials.* 2010. V. 31. № 25. P. 6612–6617.
94. Yang X., Shi C., Tong R., Qian W., Zhou H.E., Wang R., Zhu G., Cheng J., Yang V.W., Cheng T., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2010. V. 16. № 10. P. 2833–2844.
95. Luo S., Tan X., Qi Q., Guo Q., Ran X., Zhang L., Zhang E., Liang Y., Weng L., Zheng H., et al. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 9. P. 2244–2251.
96. Miller S.E., Tummers W.S., Teraphongphom N., van den Berg N.S., Hasan A., Ertsey R.D., Nagpal S., Recht L.D., Plowey E.D., Vogel H., et al. // *J. Neurooncol.* 2018. V. 139. № 1. P. 135–143.
97. Haugland R.P. *Handbook of fluorescent probes and research products.* 9. ed. Eugene, Or.: Molecular Probes, Inc, 2002.
98. van Keulen S., Nishio N., Fakurnejad S., Birkeland A., Martin B.A., Lu G., Zhou Q., Chirita S.U., Forouzanfar T., Colevas A.D., et al. // *J. Nucl. Med.* 2019. V. 60. № 6. P. 758–763.
99. Warram J.M., de Boer E., Korb M., Hartman Y., Kovar J., Markert J.M., Gillespie G.Y., Rosenthal E.L. // *Br. J. Neurosurg.* 2015. V. 29. № 6. P. 850–858.
100. Kovar J.L., Curtis E., Othman S.F., Simpson M.A., Michael Olive D. // *Anal. Biochem.* 2013. V. 440. № 2. P. 212–219.
101. Polikarpov D.M., Campbell D.H., McRobb L.S., Wu J., Lund M.E., Lu Y., Deyev S.M., Davidson A.S., Walsh B.J., Zvyagin A.V., et al. // *Cancers.* 2020. V. 12. № 4. P. 984.
102. Sampath L., Kwon S., Ke S., Wang W., Schiff R., Mawad M.E., Sevick-Muraca E.M. // *J. Nucl. Med.* 2007. V. 48. № 9. P. 1501–1510.
103. Heath C.H., Deep N.L., Beck L.N., Day K.E., Sweeny L., Zinn K.R., Huang C.C., Rosenthal E.L. // *Otolaryngol. Neck Surg.* 2013. V. 148. № 6. P. 982–990.
104. Rosenthal E.L., Warram J.M., de Boer E., Chung T.K., Korb M.L., Brandwein-Gensler M., Strong T.V., Schmalbach C.E., Morlandt A.B., Agarwal G., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2015. V. 21. № 16. P. 3658–3666.
105. Zinn K.R., Korb M., Samuel S., Warram J.M., Dion D., Killingsworth C., Fan J., Schoeb T., Strong T.V., Rosenthal E.L. // *Mol. Imaging Biol.* 2015. V. 17. № 1. P. 49–57.
106. Mérian J., Gravier J., Navarro F., Texier I. // *Molecules.* 2012. V. 17. № 5. P. 5564–5591.
107. Yuan A., Wu J., Tang X., Zhao L., Xu F., Hu Y. // *J. Pharm. Sci.* 2013. V. 102. № 1. P. 6–28.
108. Duong T., Li X., Yang B., Schumann C., Albarqi H.A., Taratula O., Taratula O. // *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2017. V. 13. № 3. P. 955–963.
109. Chen Q., Wang C., Cheng L., He W., Cheng Z., Liu Z. // *Biomaterials.* 2014. V. 35. № 9. P. 2915–2923.
110. Peng C.-L., Shih Y.-H., Lee P.-C., Hsieh T.M.-H., Luo T.-Y., Shieh M.-J. // *ACS Nano.* 2011. V. 5. № 7. P. 5594–5607.
111. Cao J., Chi J., Xia J., Zhang Y., Han S., Sun Y. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2019. V. 11. № 29. P. 25720–25729.
112. Yang H., Mao H., Wan Z., Zhu A., Guo M., Li Y., Li X., Wan J., Yang X., Shuai X., et al. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 36. P. 9124–9133.
113. Wang Y., Yang T., Ke H., Zhu A., Wang Y., Wang J., Shen J., Liu G., Chen C., Zhao Y., et al. // *Adv. Mater.* 2015. V. 27. № 26. P. 3874–3882.

УДК 615.371

Доклинические исследования иммуногенности, протективности и безопасности комбинированной векторной вакцины для профилактики ближневосточного респираторного синдрома

И. В. Должикова¹, Д. М. Гроусова¹, О. В. Зубкова¹, А. И. Тухватулин¹, А. В. Ковыршина¹, Н. Л. Лубенец¹, Т. А. Ожаровская¹, О. Полова¹, И. Б. Есмагамбетов¹, Д. В. Щебляков¹, И. М. Евграфова¹, А. А. Недорубов², И. В. Гордейчук^{1,2,3}, С. А. Гуляев³, А. Г. Ботиков¹, Л. В. Панина¹, Д. В. Мишин¹, С. Я. Логинова⁴, С. В. Борисевич⁴, П. Г. Дерябин¹, Б. С. Народицкий^{1,2}, Д. Ю. Логунов¹, А. Л. Гинцбург^{1,2}

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119435 Россия

³Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, 108819 Россия

⁴48 центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации, Московская обл., Сергиев Посад-6, 141306 Россия

*E-mail: logunov@gamaleya.org

Поступила в редакцию 21.10.2019

Принята к печати 29.05.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11042

РЕФЕРАТ Ближневосточный респираторный синдром (БВРС) – это острое воспалительное заболевание дыхательной системы, возбудителем которого является коронавирус БВРС-КоВ. Летальность при БВРС составляет 34.5%. В связи с высокой летальностью, отсутствием терапевтических и профилактических средств и сохраняющейся угрозой распространения БВРС за пределы эндемичных районов разработка вакцинного препарата является актуальной задачей, а вакцинопрофилактика против БВРС позволит ограничить распространение БВРС и снизить летальность. Нами была разработана комбинированная векторная вакцина для профилактики БВРС на основе рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 серотипа. Проведенные исследования иммуногенности показали, что вакцинация животных (мыши и приматы) позволяет сформировать мощный гуморальный иммунный ответ, который сохраняется на протяжении не менее 6 месяцев. Исследования клеточного иммунного ответа у мышей после вакцинации показали формирование выраженного специфического CD4⁺ и CD8⁺ ответа. По результатам исследования протективности вакцины на модели трансгенных мышей, несущих ген рецептора DPP4 человека, было показано, что вакцинация обеспечивает защиту 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012, 100 ЛД₅₀/мышь). Проведенные исследования безопасности и переносимости разработанной вакцины у грызунов, кроликов и приматов показали хорошую переносимость вакцины у животных и не выявили противопоказаний для проведения клинических исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аденовирусный вектор, ближневосточный респираторный синдром (БВРС), иммуногенность, оценка безопасности.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 95% ДИ – 95% доверительный интервал; Ad5 – рекомбинантный вектор на основе аденовируса человека серотипа 5; Ad26 – рекомбинантный вектор на основе аденовируса человека серотипа 26; Ad41 – рекомбинантный вектор на основе аденовируса человека серотипа 41; APC – аллофиикоцианин;

ChAdOx1 – рекомбинантный вектор на основе аденовируса шимпанзе; **DPP4** – дипептидилпептидаза 4; **MVA** – модифицированный вирус осповакцины Анкара; **RBD** – рецепторсвязывающий домен гликопротеина S БВРС-КоВ; **RBD-Fc** – рецепторсвязывающий домен гликопротеина S БВРС-КоВ, слитый с Fc IgG1 человека; **RBD-G** – рецепторсвязывающий домен гликопротеина S БВРС-КоВ, слитый с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса везикулярного стоматита; **S** – гликопротеин БВРС-КоВ; **S-G** – гликопротеин БВРС-КоВ с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса везикулярного стоматита; **ALT** – аланинаминотрансфераза; **AST** – аспартатаминотрансфераза; **БВРС (MERS)** – ближневосточный респираторный синдром; **БВРС-КоВ (MERS-CoV)** – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома; **в.ч.** – вирусные частицы; **ИФН-гамма** – интерферон гамма; **ЩФ** – щелочная фосфатаза.

ВВЕДЕНИЕ

Ближневосточный респираторный синдром (БВРС) – это острое воспалительное заболевание дыхательной системы, которое было впервые диагностировано в июне 2012 года в Саудовской Аравии [1, 2]. Возбудителем данного заболевания является коронавирус БВРС-КоВ, относящийся к семейству коронавирусов, род бетакоронавирусов. Естественным резервуаром вируса являются одногорбые верблюды, заражение человека происходит при контакте с верблюдами, употреблении непастеризованного верблюжьего молока, возможен аэрозольный путь передачи инфекции [3, 4]. Согласно данным ВОЗ, на 12 сентября 2019 года зарегистрировано 2458 лабораторно подтвержденных случаев БВРС, в том числе 848 со смертельным исходом, летальность составляет около 34,5% [5]. Большинство случаев БВРС зарегистрировано в Саудовской Аравии [6], однако заболевание также выявляли в 27 странах (Объединенные Арабские Эмираты, Южная Корея, Йемен и др.), завозные случаи инфекции были зарегистрированы в Европе, Северной Африке и Северной Америке [5]. В силу отсутствия эффективных профилактических и терапевтических препаратов против БВРС, высокого уровня летальности и широкого распространения резервуара инфекции эксперты ВОЗ относят вирус БВРС-КоВ к агентам с пандемическим потенциалом. В России случаи БВРС не зафиксированы. Однако в связи с высокой летальностью и сохраняющейся угрозой распространения БВРС за пределы эндемичных районов [5], разработка вакцинного препарата является актуальной задачей, а вакцинопрофилактика против БВРС позволит ограничить распространение БВРС и снизить летальность [7].

На сегодняшний день известно несколько кандидатных вакцинных препаратов на основе протективного антигена – гликопротеина S вируса БВРС-КоВ и его производных (субъединицы S1, рецепторсвязывающего домена): векторные вакцины (на основе рекомбинантных аденовирусов и вируса осповакцины), ДНК-вакцина на основе плазмидной ДНК, вакцины на основе рекомбинантных белков и вирусоподобных частиц [8–15]. Поскольку в защите от БВРС-КоВ важно формирование гуморального и клеточного иммунного ответа, перспективным направлением в разра-

ботке вакцин против БВРС является использование рекомбинантных вирусных векторов для доставки антигена. Такие векторы обеспечивают длительную экспрессию антигена в клетках иммунизируемого организма, что приводит к развитию протективного иммунного ответа уже после одной-двух иммунизаций. Для формирования наиболее выраженного и длительного иммунного ответа целесообразно проводить двукратную вакцинацию, при этом наиболее оптимальной схемой является гетерологичная вакцинация, когда для первичной и вторичной иммунизации используют различные вирусные векторы. Такая схема была успешно реализована при разработке вакцины против болезни, вызванной вирусом Эбола, которая зарегистрирована на территории РФ для медицинского применения и в настоящее время уже завершены пострегистрационные клинические исследования в Республике Гвинея [16].

Нами была разработана комбинированная векторная вакцина на основе рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 серотипов для профилактики БВРС, экспрессирующих гликопротеин вируса БВРС-КоВ (изолят MERS-CoV EMC/2012). В статье представлены результаты исследования поствакцинального гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей и приматов, а также результаты доклинических исследований безопасности разработанной вакцины против БВРС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемый препарат

Комбинированная векторная вакцина для профилактики БВРС состоит из двух компонентов.

Компонент 1 – рекомбинантные частицы на основе аденовируса человека 26 серотипа, несущие ген рецепторсвязывающего домена гликопротеина БВРС-КоВ, 10^{11} вирусных частиц (в.ч.) на дозу.

Компонент 2 – рекомбинантные частицы на основе аденовируса человека 5 серотипа, несущие ген полноразмерного гликопротеина БВРС-КоВ и ген рецепторсвязывающего домена гликопротеина БВРС-КоВ, 10^{11} вирусных частиц (в.ч.) на дозу.

Оба компонента представляют собой лиофилизаты для приготовления растворов для внутримышечного

введения. Препарат произведен в условиях биотехнологического производства филиала «Медгамал» «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Лабораторные животные

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации (ГОСТ Р 53434-2009, «Принципы надлежащей лабораторной практики»). Шестинедельные самки мышей C57BL/6 (18–20 г) получены из питомника Пущино (Россия). Трансгенные мыши-гибриды F1 получены в результате скрещивания трансгенных гомозиготных самцов +/+, несущих ген рецептора DPP4 человека (hDPP4) (Медицинский университет Техаса, США) и нетрансгенных самок линии C57BL/6 (Пущино, Россия). Экспрессия трансгена у мышей-гибридов F1 была подтверждена методом иммуоблота. Все мыши имели свободный доступ к воде и пище, размещались в системе содержания животных ISOcage (Tecniplast, Италия).

Обыкновенные игрунки (*Callithrix jacchus*) были рождены и содержались в специализированном виварии ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Москва, Россия). Животные содержались в Лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян («ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») в соответствии с требованиями к условиям содержания лабораторных приматов. Все экспериментальные манипуляции с игрунками проводились специалистом, имеющим сертификат Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA), прошедшим курс обучения работе с приматами (Каролинский институт, Стокгольм, Швеция) по программе Laboratory Animal Science for Researchers – Non-Human Primates (Наука о лабораторных животных для исследователей – Приматы помимо человека). Все животные идентифицировались путем подкожного введения радиочипа с уникальным 15-значным кодом (Globalvet, Москва).

Иммунизация и сбор образцов сывороток крови мышей и обыкновенных игрунок

Мышей иммунизировали внутримышечно, при этом использовали максимально широкий диапазон доз от 5×10^{11} до 10^5 в.ч./мышь. Иммунизацию проводили двукратно последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Образцы сыворотки крови мышей собирали в следующие временные точки: через 14 и 28 дней, 3 и 6 месяцев после иммунизации.

Игрунок иммунизировали внутримышечно в дозе 10^{11} в.ч./животное. Иммунизацию проводили двукрат-

но последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Образцы плазмы крови собирали в следующие временные точки: до иммунизации и через 7 и 24 дня, 3 и 6 месяцев после иммунизации.

Определение титра антител методом иммуоферментного анализа (ИФА)

Определение титра гликопротеин-специфических антител в сыворотке/плазме крови проводили методом иммуоферментного анализа. Использовали рекомбинантные белки: гликопротеин S (40069-V08B; Sino Biological, США) и RBD (40071-V08B1; Sino Biological). Забивку проводили раствором ФСБ в 0.1% Твин-20 (ФСБ-Т), содержащим 5% обезжиренного молока (A0830; AppliChem, Испания). Сыворотку/плазму титровали двукратным шагом в растворе ФСБ-Т с 3% обезжиренным молоком. Для детекции IgG мыши использовали вторичные антитела, специфические к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (NXA931; GE Healthcare, США). Для детекции IgG игрунок использовали сыворотку кролика, иммунизированного IgG мармозет, и вторичные антитела, специфические к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (NA934V; GE Healthcare, США). Проявляли с использованием раствора тетраметилбензидина (НИИОПиК, Россия). Реакцию останавливали, добавляя 1 М H_2SO_4 , оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм (OD_{450}) на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США). Титр IgG определяли как максимальное разведение сыворотки, при котором значение OD_{450} сыворотки иммунизированного животного превосходит значение контрольной сыворотки/плазмы (сыворотка/плазма контрольного животного или животного до иммунизации) более чем в 2 раза.

Определение титра вируснейтрализующих антител

Титр вируснейтрализующих антител (ВНА) в плазме крови иммунизированных животных определяли в реакции нейтрализации (РН) по подавлению цитопатического действия, вызванного вирусом БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012) в монослое клеток Vero В. Реакцию нейтрализации проводили в варианте: постоянная доза вируса – разведения сыворотки. Плазму крови обезьян инактивировали при температуре 56°C в течение 30 мин для удаления неспецифических ингибиторов. Разведения всех сывороток готовили на среде DMEM с 2% инактивированной фетальной сывороткой крупного рогатого скота, начиная с 1 : 10, затем двукратным шагом до 1 : 5120. Разведения вирусосодержащей суспензии на основе вируса БВРС-КоВ готовили на среде DMEM с 2% инактивированной фетальной сывороткой круп-

ного рогатого скота. В приготовленном разведении концентрация вируса БВРС-КоВ составила 1000 ТЦД₅₀/мл. Смесь равных объемов плазмы и суспензии вируса инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Клетки Vero B рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве 4×10^4 клеток/луночку в объеме 100 мкл, затем к ним добавляли 100 мкл смеси плазмы и суспензии вируса. Через 4 сут оценивали развитие цитопатического действия. За титр ВНА исследуемой плазмы принимали высшее ее разведение, при котором происходит подавление цитопатического действия в двух лунках из трех (по сравнению с контрольными сыворотками).

Анализ Т-клеточного ответа (лимфопролиферативный анализ) и продукции интерферона гамма (ИФН-гамма) у мышей

Животных забивали на 8 день после иммунизации и отбирали селезенки, которые гомогенизировали через сито с диаметром пор 100 мкм в стерильном ФСБ. Спленциты выделяли с помощью центрифугирования (800 g, 30 мин) на подушке раствора фикола (1.09 г/мл, «ПанЭко», Россия). Для анализа пролиферации Т-клеток спленциты окрашивали карбоксифлуоресцеином с использованием набора Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) tracer kit (Invitrogen, США) по описанной ранее методике [17]. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве 200000 клеток на луночку в среде RPMI1640, рестимулировали рекомбинантным S БВРС-КоВ (40071-V08B1; Sino Biological) в количестве 1 мкг/луночку. Через 72 ч собирали среду для последующего анализа ИФН-гамма, в это же время клетки собирали, промывали ФСБ и окрашивали антителами, специфическими к CD3, CD4 и CD8: меченные аллофикоцианином (APC) антитела к CD3, APC-Cy7-меченные антитела к CD8 и фикоэритрин-меченные антитела к CD4 (BD Biosciences, США) фиксировали в растворе 1% параформальдегида. Пролиферирующие CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты определяли в клеточной смеси с использованием проточного цитофлуориметра BD FACS Aria III (BD Biosciences). Результирующий процент пролиферирующих клеток (X) рассчитывали по формуле $X = \%st - \%$, где $\%st$ – процент пролиферирующих клеток после рестимуляции спленцитов рекомбинантным гликопротеином S вируса БВРС-КоВ, а $\%$ – процент пролиферирующих клеток без рестимуляции (интактные клетки).

Концентрацию ИФН-гамма в среде измеряли методом ИФА с помощью коммерческого набора (mouse IFN- γ ELISA kit; Invitrogen) по протоколу фирмы-производителя. Прирост концентрации ИФН-гамма определяли по формуле $X = Cst/Cint$, где X – прирост концентрации ИФН-гамма (разы), Cst – концентрация

ИФН-гамма в среде от стимулированных клеток (пг/мл), Cint – концентрация ИФН-гамма в среде от нестимулированных (интактных) клеток (пг/мл).

Исследование протективной эффективности

Протективную эффективность вакцины изучали на модели летальной инфекции у трансгенных мышей, несущих ген рецептора hDPP4 человека, полученных от скрещивания гомозиготных трансгенных самцов hDPP4^{+/+} и нетрансгенных самок линии C57BL/6. Животных иммунизировали внутримышечно двукратно последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом 21 день. Через 7 дней после введения компонента 2 мышью заражали интраназально вирусом БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012) в дозе 100 ЛД₅₀ на животное, затем наблюдали выживаемость в течение 30 дней.

Доклинические исследования безопасности

Доклинические исследования безопасности комбинированной векторной вакцины против БВРС были проведены совместно с АНО «ИМБИИТ» и ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [18] и «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [19]. В рамках исследований безопасности было проведено изучение токсичности при однократном и повторном введении, изучение репродуктивной и онтогенетической токсичности, иммуногенности и аллергенности. Всего в доклинических исследованиях безопасности было использовано: мышей – 670 особей, крыс – 725 особей, кроликов – 24 особи, морских свинок – 120 особей, обыкновенных игрунок – 6 особей.

Переносимость вакцины приматами анализировали ежедневно по оценке физического состояния животных, а также наличие общих симптомов интоксикации, которые включали оценку поведения, внешнего вида и физиологических функций. Лабораторную оценку переносимости вакцины у игрунок проводили на основе мониторинга массы тела, ректальной температуры и биохимических показателей крови: общего билирубина, прямого билирубина, аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), креатинина, общего белка и щелочной фосфатазы (ЩФ). Исследования проводили на полностью автоматических анализаторах СА-180 и В-200 (Furuno, Япония) с использованием наборов реагентов DiaSys (Германия).

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерных программ GraphPad

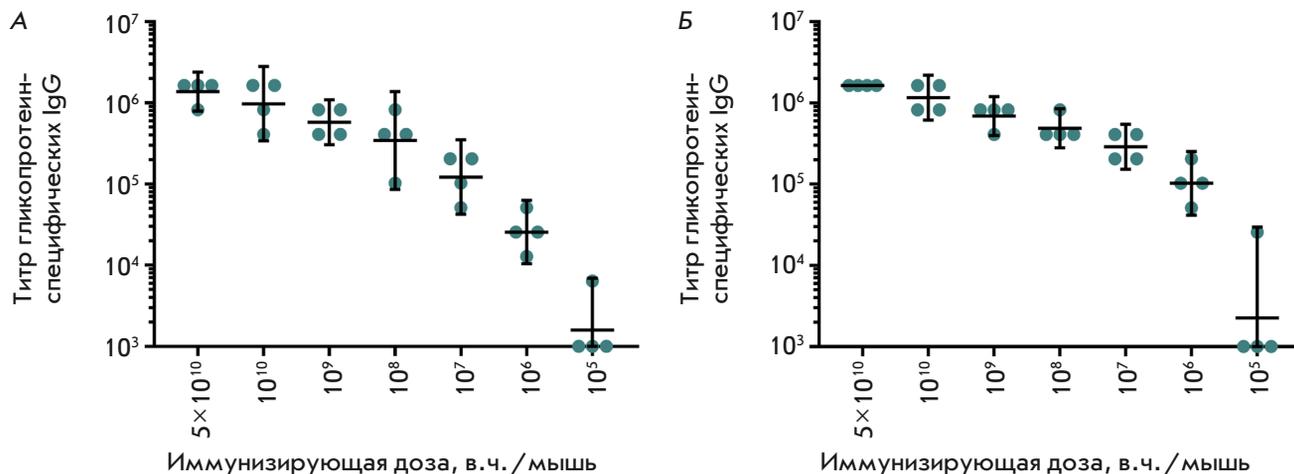


Рис. 1. Титры гликопротеин-специфических IgG в сыворотках крови иммунизированных животных через 2 (А) и 4 недели (Б) после бустерной вакцинации. По оси абсцисс представлены иммунизирующие дозы (в.ч./мышь), по оси ординат – реципрокные титры IgG. Также отмечены геометрические средние титров и 95% доверительный интервал

7.0. При анализе данных несвязанных выборок использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок или критерий Манна–Уитни в зависимости от нормальности распределения данных [20]. При анализе данных связанных выборок использовали t-критерий Стьюдента для парных выборок или критерий Уилкоксона в зависимости от нормальности распределения данных [20]. Для определения нормальности распределения данных использовали обобщенный тест Дагостино–Пирсона [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Иммунизация животных комбинированной векторной вакциной индуцирует формирование длительного выраженного гуморального иммунного ответа к гликопротеину БВРС-Ков у мышей и приматов

Для подбора эффективной дозы мышей внутримышечно иммунизировали вакциной в дозах: 10^5 – 10^{10} , 5×10^{10} в.ч./мышь, через 2 и 4 недели после иммунизации собирали сыворотки крови и анализировали титры гликопротеин-специфических антител. Далее у животных отбирали сыворотки крови через 2 и 4 недели и исследовали напряженность поствакцинального гуморального иммунного ответа по титру гликопротеин-специфических IgG (рис. 1).

Анализ полученных результатов позволяет заметить дозозависимое увеличение титра гликопротеин-специфических IgG в сыворотке крови. При этом минимальная доза комбинированной векторной вакцины, необходимая для формирования напряженного гуморального иммунного ответа у всех вакцинируемых животных, – 10^6 в.ч./мышь. Определение длительности поствакцинального гуморального иммунного отве-

та показало, что через 6 месяцев после иммунизации в сыворотке крови мышей детектируются гликопротеин-специфические антитела в высоком титре (среднее геометрическое титра составило $1 : 182456$, рис. 2).

Далее мы изучили напряженность гуморального иммунного ответа у приматов, вакцинированных разработанной вакциной. Для определения напряженности гуморального иммунитета обыкновенных игрунок (*C. jacchus*) иммунизировали комбинированной вакциной согласно схеме, предполагаемой для использования в клинической практике, – последовательно компонентом 1 (в дозе 10^{11} в.ч./животное) и компонентом 2 (в дозе 10^{11} в.ч./животное) вакцины с интервалом 21 день. Далее через 7 и 24 дня, а также 3 и 6 месяцев после бустерной иммунизации у животных отбирали плазму крови для анализа титра гликопротеин-специфических IgG (рис. 3А). Показано, что иммунизация приматов приводит к формированию вы-

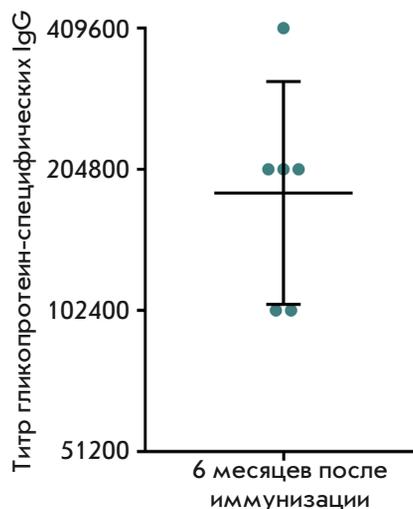


Рис. 2. Титры гликопротеин-специфических IgG в сыворотках крови иммунизированных животных через 6 месяцев после вакцинации. По оси ординат представлены реципрокные титры IgG. Также отмечены геометрическое среднее титра и 95% доверительный интервал (n = 6)

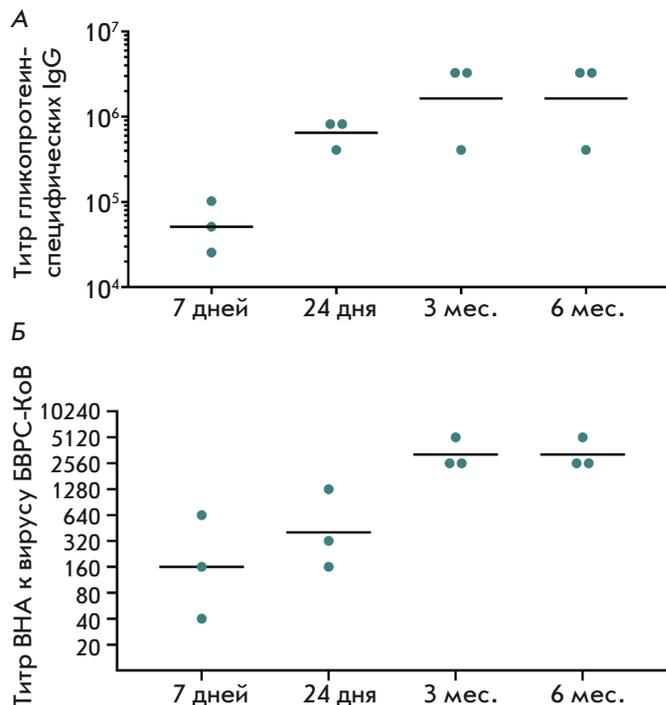


Рис. 3. А – титры гликопротеин-специфических IgG в плазме крови иммунизированных игрунок после вакцинации. По оси ординат представлены реципрокные титры IgG, по оси абсцисс – время после иммунизации. Отмечены индивидуальные титры для каждой особи, а также геометрическое среднее титра ($n = 3$). Б – титры вируснейтрализующих антител в плазме крови иммунизированных игрунок после вакцинации. По оси ординат представлены реципрокные титры ВНА к вирусу БВРС-КоВ, по оси абсцисс – время после иммунизации

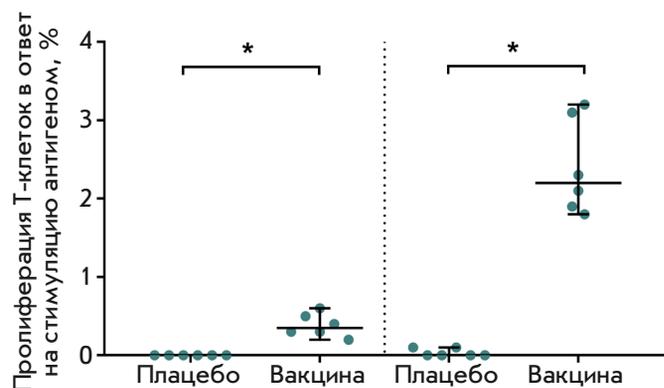


Рис. 4. Исследование лимфопролиферативной активности спленоцитов у иммунизированных вакциной и препаратом плацебо мышей. Отмечены уровни (в %) пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, рестимулированных белком S БВРС-КоВ на 18-й день после вакцинации. Отмечены медианы процента пролиферирующих клеток после рестимуляции и 95% ДИ медианы для каждой группы ($n = 6$). * $p < 0.05$

раженного гуморального иммунного ответа, который сохраняется не менее 6 месяцев. Так, титры гликопротеин-специфических IgG у приматов через 6 месяцев после иммунизации не отличались от титров через 3 месяца, что свидетельствует о формировании длительного иммунного ответа. При анализе титра вируснейтрализующих антител к вирусу БВРС-КоВ в плазме крови иммунизированных обезьян мы обнаружили, что уже через 7 дней после бустирующей иммунизации у животных детектируются ВНА, максимальный титр которых достигался через 3 и 6 месяцев после иммунизации (рис. 3Б). В плазме крови контрольных животных и животных до иммунизации ВНА не выявлены.

Таким образом, изучение напряженности поствакцинального иммунного ответа показало, что иммунизация мышей и приматов приводит к формированию мощного гуморального иммунного ответа, который сохраняется на протяжении не менее полугода после иммунизации животных.

Иммунизация мышей кандидатной вакциной индуцирует формирование выраженного клеточного иммунного ответа

Для оценки напряженности поствакцинального клеточного иммунного ответа мышей иммунизировали кандидатной вакциной против БВРС однократно в дозе 10⁷ в.ч./мышь. Через 18 дней после иммунизации у животных отбирали селезенки, выделяли спленоциты, определяли количество пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в культуре спленоцитов *in vitro* после рестимуляции клеток рекомбинантным белком S БВРС-КоВ (рис. 4). По результатам исследования было показано, что введение комбинированной векторной вакцины индуцирует формирование S-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

Активацию клеточного звена иммунитета дополнительно анализировали по экспрессии ИФН-гамма. Результаты исследования прироста концентрации ИФН-гамма в среде *in vitro* культуры спленоцитов мышей после повторной стимуляции клеток рекомбинантным белком S БВРС-КоВ представлены на рис. 5. Показано, что введение вакцины индуцирует прирост концентрации ИФН-гамма в среде при стимуляции спленоцитов иммунизированных мышей гликопротеином S БВРС-КоВ. Концентрация ИФН-гамма в среде повышается при этом в среднем в 22 раза.

Резюмируя данные анализа антиген-специфической лимфопролиферативной активности CD4⁺ и CD8⁺ клеток и уровня экспрессии ИФН-гамма рестимулированными спленоцитами, можно заключить, что иммунизация животных комбинированной вакциной против БВРС приводит к формированию гликопротеин-специфического клеточного иммунного ответа.

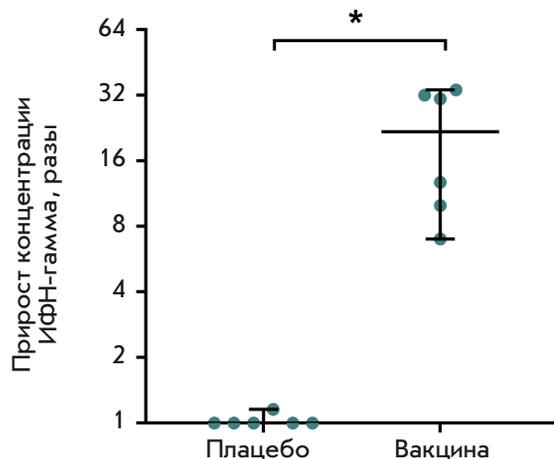


Рис. 5. Прирост концентрации ИФН-гамма в среде спленоцитов иммунизированных и неиммунизированных мышей после рестимуляции рекомбинантным полноразмерным белком S вируса БВРС-КоВ. Отмечены медианы прироста концентрации ИФН-гамма после рестимуляции и 95% ДИ медианы для каждой группы ($n = 6$). * $p < 0.05$

Комбинированная векторная вакцина защищает животных от летальной инфекции, вызванной вирусом БВРС-КоВ

Исследование проводили на модели летальной инфекции, вызванной БВРС-КоВ, у трансгенных мышей, несущих ген рецептора DPP4 человека. Мышей иммунизировали последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Через неделю после введения компонента 2 вакцины животных заражали интраназально вирусом БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012) в дозе 100 ЛД₅₀ на животное и оценивали выживаемость в течение 30 дней. Показано, что иммунизация животных комбинированной векторной вакциной позволяет защитить 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом БВРС-КоВ. В контрольной группе погибли все животные (не вакцинированные) (рис. 6).

Комбинированная векторная вакцина для профилактики БВРС имеет благоприятный профиль безопасности и переносимости у животных

Общую и специфическую токсичность (токсичность при однократном и повторном введении, оценка местно-раздражающего действия, иммунотоксичность, аллергизирующие свойства и репродуктивная токсичность) оценивали на грызунах (мыши, крысы, морские свинки) и крупных животных (кролики). Было показано, что комбинированная векторная вакцина против БВРС не вызывает токсических эффектов, не оказывает аллергизирующего и иммунотоксического действия, не приводит к изменению

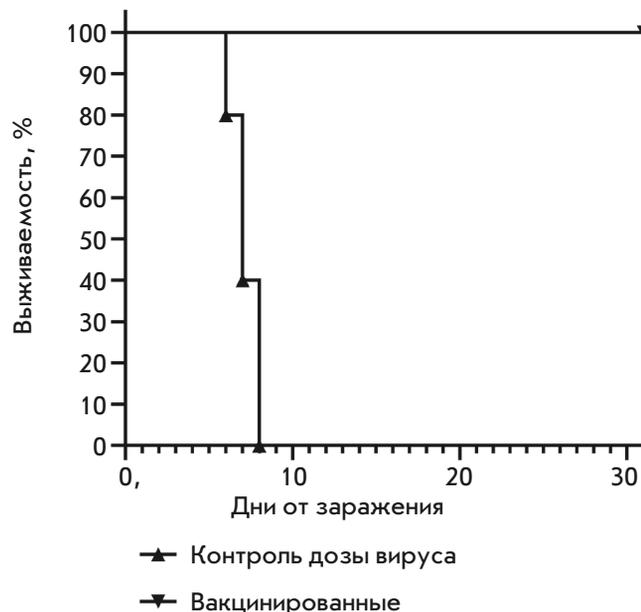


Рис. 6. Выживаемость вакцинированных ($n = 10$) и невакцинированных (контроль дозы вируса, $n = 10$) животных при заражении БВРС-КоВ

генеративной функции, не обладает местно-раздражающим действием и может быть рекомендована для проведения клинических исследований.

Переносимость вакцины изучена также на приматах. За период наблюдения не было выявлено отклонений в физическом состоянии животных, иммунизированных комбинированной векторной вакциной против БВРС, и животных из контрольной группы по анализируемым параметрам (поведенческие реакции, внешний вид, физиологические функции). В ходе эксперимента показатели ректальной температуры, изменения массы тела, а также биохимические показатели у всех животных находились в рамках нормальных для данного вида значений (рис. 7). Резюмируя полученные данные, можно заключить, что комбинированная векторная вакцина против БВРС показала хорошую переносимость на модели обыкновенных игрунок.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время в мире не существует специфических профилактических и терапевтических средств против ближневосточного респираторного синдрома. Интенсивные исследования по разработке вакцин против этого заболевания сегодня ведутся в США, Германии, Корею, Китае, Великобритании и других странах. Среди профилактических препаратов, показавших наибольшую эффективность в доклинических исследованиях, необходимо отметить кандидатные вакцины на основе: аденовирусных векторов (Ad5, Ad41, ChAdOx1) [22, 23], модифици-

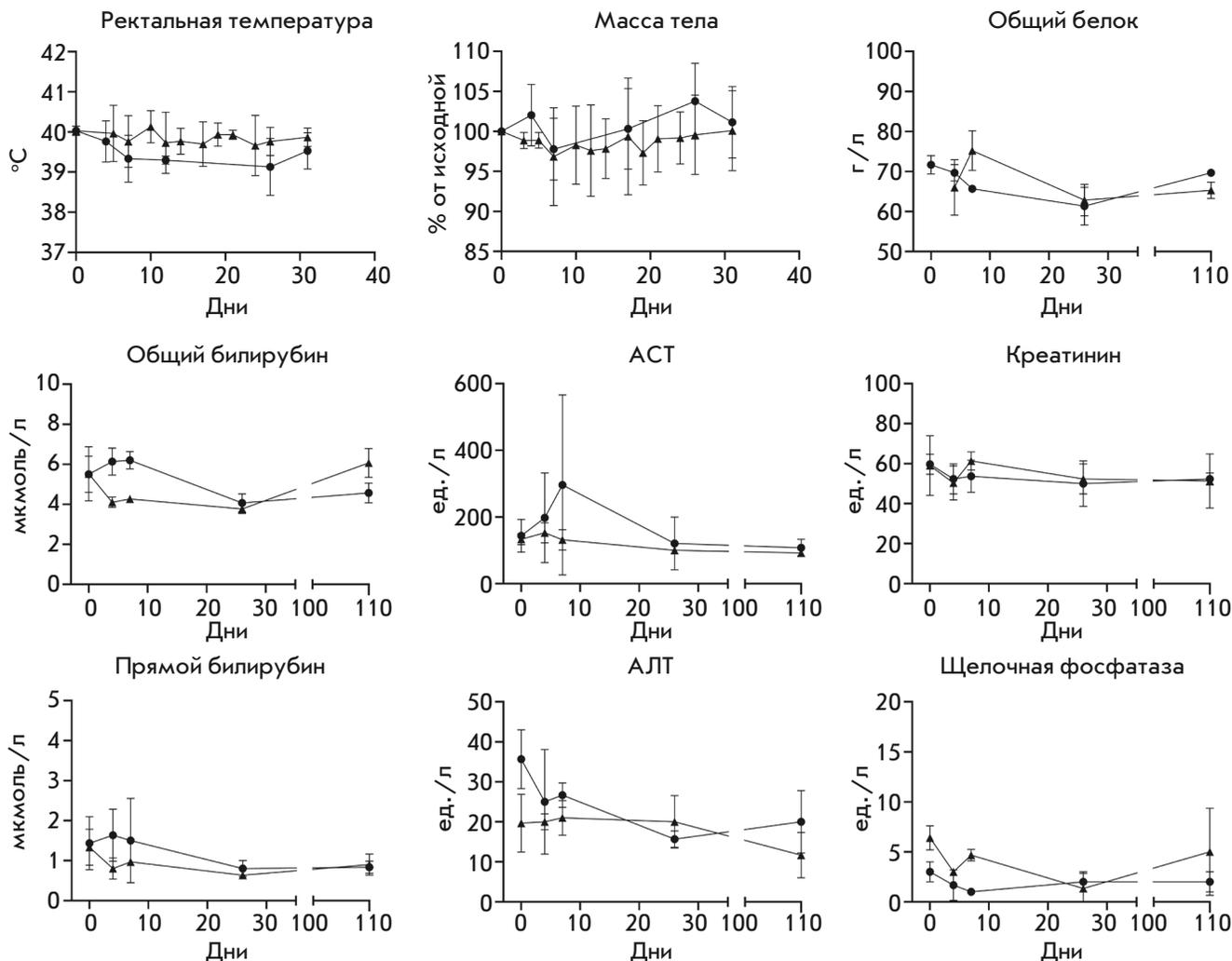


Рис. 7. Ректальная температура, масса тела и биохимические показатели крови приматов (обыкновенных игрунок), иммунизированных комбинированной векторной вакциной против БВРС (отмечены треугольниками), и контрольных животных (отмечены кругами)

рованного вируса осповакцины Анкара (MVA) [24], кодирующих протективный антиген S БВРС-КоВ, а также препараты рекомбинантного протективного антигена S БВРС-КоВ [25, 26]. Два препарата находятся на стадии клинических исследований: две вакцины на основе рекомбинантных вирусных векторов MERS001 (на основе аденовируса шимпанзе, 1 фаза) [27] и MVA-MERS-S (на основе вируса осповакцины, 2 фаза) [28]. Клинические исследования первой фазы вакцины на основе плазмидной ДНК GLS-5300, а также вакцины на основе вируса осповакцины MVA-MERS-S завершены [29, 30].

Все вакцины, вышедшие в клинические исследования, основаны на использовании гликопротеина S вируса БВРС-КоВ. Этот гликопротеин выполняет одну из важнейших задач в жизненном цикле вируса – обеспечивает его интернализацию путем взаимодействия с рецептором DPP4 на поверхности

клетки. Нейтрализация такого взаимодействия позволяет ограничивать проникновение вируса в клетку, что приводит к снижению его репликации.

Поскольку для защиты от БВРС важно формирование не только гуморального, но и клеточного иммунного ответа, перспективным направлением является разработка вакцин на основе рекомбинантных вирусных векторов. Такие векторы эффективно доставляют в клетки генетический материал, кодирующий антиген, что приводит к экспрессии антигена непосредственно самими клетками и формированию выраженного клеточного и гуморального иммунного ответа. Важным свойством рекомбинантных вирусных векторов является и то, что они позволяют сформировать протективный иммунный ответ уже после 1–2 иммунизаций, что крайне важно при разработке вакцин для профилактики опасных и особо опасных инфекций, применение которых планируется в рам-

ках разворачивающихся эпидемий или в случае завоза инфекции на неэндемичные территории.

Ранее нами было проведено исследование иммуногенности различных форм гликопротеина S вируса БВРС-КоВ: полноразмерный гликопротеин (S), полноразмерный гликопротеин с трансмембранным доменом белка G вируса везикулярного стоматита (S-G), секретируемый рецепторсвязывающий домен гликопротеина (RBD), секретируемый рецепторсвязывающий домен гликопротеина, слитый с Fc-фрагментом IgG1 человека (RBD-Fc) и мембранная форма рецепторсвязывающего домена гликопротеина (RBD-G) [31] – по результатам которых было показано, что для формирования наиболее мощного гуморального иммунного ответа необходимо использовать мембранную форму рецепторсвязывающего домена, а для формирования выраженного клеточного иммунного ответа – полноразмерный гликопротеин. При выборе схемы иммунизации важно учитывать, что для формирования длительного иммунного ответа целесообразно использовать подход гетерологичной двукратной вакцинации, когда для первичной и для вторичной иммунизации используют два разных рекомбинантных вирусных вектора. В связи с этим в состав комбинированной вакцины против БВРС вошли два рекомбинантных вектора на основе аденовирусов человека 26 и 5 серотипов. В состав компонента 1 вошел рекомбинантный вектор rAd26-RBD-G, а в состав компонента 2 вакцины вошли два рекомбинантных вектора rAd5-S и rAd5-RBD-G.

Исследования иммуногенности комбинированной векторной вакцины показали, что у мышей формируется длительный гуморальный иммунный ответ, при этом титр гликопротеин-специфических антител через 2 недели после вакцинации в дозе 10^7 в.ч./мышь составил в среднем 1/121775. Схожий титр антител наблюдали Alharbi с соавт. у мышей через 28 дней после иммунизации вакциной против БВРС на основе аденовируса шимпанзе ChAdOx1 MERS [12], однако для иммунизации мышей они использовали дозу 10^8 в.ч./мышь. В дальнейшем исследовании Munster с соавт. показали [13], что иммунизация трансгенных мышей, несущих ген рецептора DPP4 человека, вакциной ChAdOx1 MERS в дозе 10^8 в.ч./мышь позволяет защитить 100% животных от летальной инфекции, вызванной БВРС-КоВ. В работе Hashem с соавт., которые разработали препарат на основе rAd5, несущего последовательность S1 БВРС-КоВ, показано, что двукратная иммунизация мышей препаратом в дозе 10^9 в.ч./мышь приводила к формированию гуморального иммунного ответа, при этом титр гликопротеин-специфических IgG составил 1/70000 через 3 недели после второй иммунизации (полтора месяца от начала иммунизации), а также позволяла

защитить 100% животных от инфекции, вызванной БВРС-КоВ [32].

Показано, что уже через неделю после бустирующей иммунизации у животных в плазме крови детектируются гликопротеин-специфические антитела в титре 1/25600 – 1/102400. Важно отметить, что в работе Muthumani с соавт. [33] у приматов после длительной трехкратной иммунизации ДНК-вакциной на протяжении 6 недель детектируют гликопротеин-специфические антитела в титре 1/20000, а также показано, что иммунизация приматов ДНК-вакциной позволяет защитить их от инфекции, вызванной БВРС-КоВ.

Исследование поствакцинального гуморально-иммунного ответа у мышей и приматов показало, что у животных напряженный гуморальный иммунный ответ сохраняется на протяжении не менее 6 месяцев после вакцинации. Исследования клеточного звена иммунитета у мышей показали, что введение разработанной вакцины позволяет сформировать полноценный клеточный ответ, при этом важно, что развивается не только CD4⁺ ответ, но также и CD8⁺, который может играть важную роль в защите от БВРС-КоВ [34, 35].

По завершении исследований иммуногенности комбинированной векторной вакцины на модели летальной инфекции у трансгенных мышей, несущих ген рецептора DPP4 человека, была изучена протективность этой вакцины. Показано, что вакцина защищает 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом БВРС-КоВ. В серии доклинических исследований безопасности вакцины не было выявлено противопоказаний к проведению клинических исследований разработанной вакцины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе изучена иммуногенность и безопасность комбинированной векторной вакцины для профилактики ближневосточного респираторного синдрома. Проведенные исследования показали следующее:

Вакцинация животных индуцирует формирование напряженного гуморального иммунного ответа на гликопротеин S БВРС-КоВ, который сохраняется на протяжении не менее 6 месяцев.

Вакцинация животных индуцирует формирование напряженного клеточного иммунного ответа на гликопротеин S БВРС-КоВ.

Вакцинация животных индуцирует формирование протективного иммунного ответа, который защищает 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом БВРС-КоВ.

Доклинические исследования безопасности вакцины не выявили противопоказаний к проведению клинических исследований. ●

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Исследование финансировано Министерством здравоохранения Российской Федерации (Государственные задания № 056-00108-18-00, 056-00078-19-00).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L., Fouchier R.A.M., Galiano M., Gorbalenya A.E., Memish Z.A., et al. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 14. P. 7790–7792.
2. Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. // *N. Engl. J. Med.* 2012. V. 367. № 19. P. 1814–1820.
3. Memish Z.A., Cotten M., Meyer B., Watson S.J., Alshahafi A.J., Al Rabeeah A.A., Corman V.M., Sieberg A., Makhdoom H.Q., Assiri A., et al. // *Emerg. Infect. Dis.* 2014. V. 20. № 6. P. 1012–1015.
4. Reusken C.B., Farag E.A., Jonges M., Godeke G.J., El-Sayed A.M., Pas S.D., Raj V.S., Mohran K.A., Moussa H.A., Ghobashy H., et al. // *Euro Surveill.* 2014. V. 19. № 23. P. 1–5.
5. World Health Organisation. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 2019. URL: <http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/> (дата обращения: 15.10.19).
6. Aly M., Elrobh M., Alzayer M., Aljuhani, S., Balkhy H. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 10. P. 1–11.
7. World Health Organisation. WHO Research and Development Blueprint: 2017 Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint). 2017. URL: <http://www.who.int/blueprint/what/research-development/2017-Prioritization-Long-Report.pdf> (дата обращения: 15.10.19).
8. Okba N.M., Raj V.S., Haagmans B.L. // *Curr. Opin. Virol.* 2017. V. 23. P. 49–58.
9. Ma C., Wang L., Tao X., Zhang N., Yang Y., Tseng C.T.K., Li F., Zhou Y., Jiang S., Du L. // *Vaccine.* 2014. V. 32. № 46. P. 6170–6176.
10. Nyon M.P., Du L., Tseng C.K., Seid C.A., Pollet J., Naceanceno K.S., Agrawal A., Algaissi A., Peng B.H., Tai W., et al. // *Vaccine.* 2018. V. 36. № 14. P. 1853–1862.
11. Tai W., Zhao G., Sun S., Guo Y., Wang Y., Tao X., Tseng C.K., Li F., Jiang S., Du L., et al. // *Virology.* 2016. V. 499. P. 375–382.
12. Alharbi N.K., Padron-Regalado E., Thompson C.P., Kupke A., Wells D., Sloan M.A., Grehan K., Temperton N., Lambe T., Warimwe G., et al. // *Vaccine.* 2017. V. 35. № 30. P. 3780–3788.
13. Munster V.J., Wells D., Lambe T., Wright D., Fischer R.J., Bushmaker T., Saturday G., Van Doremalen N., Gilbert S.C., De Wit E., et al. // *NPJ Vaccines.* 2017. V. 2. P. 28.
14. Malczyk A.H., Kupke A., Prüfer S., Scheuplein V.A., Hutzler S., Kreuz D., Beissert T., Bauer S., Hubich-Rau S., Tondera C., et al. // *J. Virol.* 2015. V. 89. № 22. P. 11654–11667.
15. Modjarrad K. // *Vaccine.* 2016. V. 34. № 26. P. 2982–2987.
16. International Multicenter Study of the Immunogenicity of Medicinal Product GamEvac-Combi. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03072030. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03072030> (дата обращения: 15.10.19).
17. Quah B.J., Warren H.S., Parish C.R. // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. № 9. P. 2049–2056.
18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. / Под ред. Миронова А.Н. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
19. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. / Под ред. Хабриева Р.У. М.: Медицина, 2005. 832 с.
20. Унгурияну Т.Н., Гржибовский А.М. // *Экология человека.* 2011. № 5. С. 55–60.
21. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика. Учебное пособие. Пер. с англ. / Под ред. Леонова В.П. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015.
22. Guo X., Deng Y., Chen H., Lan J., Wang W., Zou X., Hung T., Lu Z., Tan W. // *Immunology.* 2015. V. 145. № 4. P. 476–484.
23. Kim E., Okada K., Kenniston T., Raj V.S., AlHajri M.M., Farag E.A., AlHajri F., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Gambotto A. // *Vaccine.* 2014. V. 32. № 45. P. 5975–5982.
24. Volz A., Kupke A., Song F., Jany S., Fux R., Shams-Eldin H., Schmidt J., Becker C., Eickmann M., Becker S., et al. // *J. Virol.* 2015. V. 89. № 16. P. 8651–8656.
25. Coleman C.M., Venkataraman T., Liu Y.V., Glenn G.M., Smith G.E., Flyer D.C., Frieman M.B. // *Vaccine.* 2017. V. 35. № 12. P. 1586–1589.
26. Tang J., Zhang N., Tao X., Zhao G., Guo Y., Tseng C.T., Jiang S., Du L., Zhou Y. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015. V. 11. № 5. P. 1244–1250.
27. Safety and Immunogenicity of a Candidate MERS-CoV Vaccine (MERS001). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03399578 URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03399578> (дата обращения: 15.10.19).
28. Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Phase Ib Study to Assess the Safety and Immunogenicity of MVA-MERS-S_DF-1. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04119440 URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04119440> (дата обращения: 15.10.19).
29. Phase I, Open Label Dose Ranging Safety Study of GLS-5300 in Healthy Volunteers ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02670187 URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02670187> (дата обращения: 15.10.19).
30. Safety, Tolerability and Immunogenicity of Vaccine Candidate MVA-MERS-S. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03615911 URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03615911> (дата обращения: 15.10.19).
31. Ozharovskaia T.A., Zubkova O.V., Dolzhikova I.V., Gromova A.S., Grousova D.M., Tukhvatulin A.I., Popova O., Shchelyakov D.V., Scherbinin D.N., Dzharullaeva A.S., et al. // *Acta Naturae.* 2019. V. 11. № 1. P. 38–47.
32. Hashem A.M., Algaissi A., Agrawal A.S., Al-Amri S.S., Alhabbab R.Y., Sohrab S.S., Almasoud A., Alharbi N.K., Peng B.H., Russell M., et al. // *J. Infect. Dis.* 2019. V. 220. № 10. P. 1558–1567.
33. Muthumani K., Falzarano D., Reuschel E.L., Tingey C., Flin-gai S., Villarreal D.O., Wise M., Patel A., Izmirly A., Aljuaid A., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2015. V. 7. № 301. P. 301ra132.
34. Zhao J., Li K., Wohlford-Lenane C., Agnihothram S.S., Fett C., Zhao J., Gale M.J. Jr., Baric R.S., Enjuanes L., Gallagher T., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 13. P. 4970–4975.
35. Zhao J., Alshukairi A.N., Baharoon S.A., Ahmed W.A., Bokhari A.A., Nehdi A.M., Layqah L.A., Alghamdi M.G., Al Gethamy M.M., Dada A.M., et al. // *Sci. Immunol.* 2017. V. 2. № 14. P. eaan5393.

УДК 577.2:616-06

GLAD-ПЦР-анализ сайтов метилирования ДНК в регуляторных областях генов-онкосупрессоров при раке желудка

Б. С. Малышев¹, Н. А. Нетесова¹, Н. А. Сметанникова¹, М. А. Абдурашитов², А. Г. Акишев², Е. В. Дубинин², А. З. Азанов³, И. В. Вихлянов⁴, М. К. Никитин⁴, А. Б. Карпов⁵, С. Х. Дегтярев^{1,2}

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, 630559 Россия

²ООО «ЭпиДжин», Новосибирск, 630090 Россия

³Областной клинический онкологический диспансер, Кемерово, 650036 Россия

⁴Алтайский краевой онкологический диспансер, Алтайский край, Барнаул, 656049 Россия

⁵Северский биофизический научный центр ФМБА России, Томская обл., Северск, 636039 Россия

*E-mail: evgeny.dubinin@epigene.ru

Поступила в редакцию 20.01.2020

Принята к печати 22.07.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11070

РЕФЕРАТ На ранних стадиях канцерогенеза опухолевая ДНК подвергается aberrантному метилированию регуляторных областей ряда генов-онкосупрессоров по сайтам RCGY, служащих субстратом для ДНК-метилтрансферазы Dnmt3. Выявление aberrантно метилированных сайтов в ДНК различных опухолей считается первым шагом в создании эпигенетических ПЦР тест-систем для ранней диагностики онкозаболеваний. Ранее мы разработали метод GLAD-ПЦР, позволяющий определять сайт R(5mC)GY в конкретной позиции генома человека даже в условиях значительного избытка молекул ДНК с неметилированным сайтом RCGY в этой позиции. Цель настоящей работы состояла в определении aberrантно метилированных сайтов R(5mC)GY в регуляторных областях генов-онкосупрессоров (*brinp1*, *bves*, *cacna2d3*, *cdh11*, *cpeb1*, *epha7*, *fgf2*, *galr1*, *gata4*, *hopx*, *hs3st2*, *irx1*, *lrrc3b*, *pcdh10*, *rprm*, *runx3*, *sfrp2*, *sox17*, *tcf21*, *tfpi2*, *wnt5a*, *zfp82* и *znf331*) в препаратах ДНК из тканей рака желудка с помощью GLAD-ПЦР-анализа. На образцах ДНК из операционного материала опухолей ($n = 29$) и морфологически неизмененных тканей ($n = 25$) показан высокий диагностический потенциал панели эпигенетических онкомаркеров рака желудка, состоящей из сайтов R(5mC)GY в регуляторных участках генов *irx1*, *cacna2d3* и *epha7*: суммарные показатели чувствительности и специфичности составляют 96.6 и 100.0% соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рак желудка, гены-онкосупрессоры, метилирование ДНК, GLAD-ПЦР-анализ, метилзависимая сайт-специфичная ДНК-эндонуклеаза Glal.

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) – одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний, занимающее третье место в мире по числу смертельных исходов (более 700 тысяч в год) [1]. По данным ВОЗ, в 2018 году диагностировано свыше 1 млн новых случаев РЖ, а число умерших составило примерно 783 тысячи [2].

Прогноз заболевания в значительной степени зависит от клинической стадии, но в целом остается достаточно неблагоприятным: только у 40% пациентов к моменту постановки диагноза болезнь явля-

ется потенциально излечимой, а общая пятилетняя выживаемость при РЖ в большинстве стран мира не превышает 25–30% [3, 4]. Вместе с тем выявление заболевания на ранней стадии (IA–IB) позволяет увеличить этот показатель до 80% и более [5, 6].

Перспективным инструментом раннего выявления и мониторинга РЖ считается эпигенетическая ДНК-диагностика, включающая определение aberrантно метилированных регуляторных участков генов-онкосупрессоров в опухолевой ДНК, которые инактивируются при такой модификации. Aberrантное метилирование характерно для на-

чальных стадий большинства ненаследственных (спорадических) форм рака, составляющих в среднем более 90% всех случаев злокачественных новообразований [7, 8].

Известно, что метилирование ДНК *de novo*, в том числе и aberrантное, осуществляют ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a и Dnmt3b, которые узнают преимущественно сайт RCGY (где R – А или G, Y – Т или С) и модифицируют его с образованием последовательности R(5mC)GY в обеих цепях ДНК [5]. В дальнейшем метилирование таких сайтов поддерживается в ходе репликации ДНК-метилтрансферазой Dnmt1 [9].

Метилзависимая сайт-специфичная ДНК-эндонуклеаза GlaI узнает и расщепляет именно сайты R(5mC)GY, что делает ее удобным инструментом для изучения метилирования ДНК [10]. На основе уникальной специфичности фермента GlaI нами ранее был разработан метод GLAD-ПЦР, позволяющий выявлять сайты R(5mC)GY в геноме даже в условиях значительного избытка молекул ДНК, в которых эти сайты неметилированы [11].

GLAD-ПЦР отличается более высокой чувствительностью и воспроизводимостью результатов в сравнении с общепринятым методом бисульфитного секвенирования ДНК, поскольку бисульфитная конверсия часто сопровождается существенной деградацией ДНК и значительными потерями исследуемого материала [11].

Ранее мы применили метод GLAD-ПЦР для изучения метилирования генов-онкосупрессоров в тканях колоректального рака и выявили aberrантное метилирование сайтов RCGY в генах *fbn1*, *cnrip1*, *adhfe1*, *ryr2*, *sept9l* и *eid3* более чем в 75% образцов опухолевой ДНК [12, 13].

Цель данной работы состояла в применении GLAD-ПЦР-анализа для обнаружения aberrантно метилированных сайтов R(5mC)GY в регуляторных областях генов-онкосупрессоров в ДНК из тканей РЖ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом для анализа служили образцы ДНК, выделенные из опухолей слизистой желудка, полученных от 29 пациентов в ходе оперативного вмешательства. Во всех случаях диагностирована аденокарцинома желудка различной степени дифференцировки. Пять больных имели I клиническую стадию заболевания (T1N0-1M0, T2N0M0), 11 – II стадию (T1N2-3M0, T2N1-2M0, T3N0-1M0, T4aN0M0), 10 – III стадию (T2N3M0, T3N2-3M0, T4aN1-3M0, T4bN0-3M0), у трех пациентов выявлена IV стадия РЖ (наличие отдаленных метастазов (M1) при любом размере первичной опухоли (T) и наличии или от-

сутствии метастатического поражения регионарных лимфатических узлов (N)).

В качестве сравнительного контроля использовали образцы ДНК, выделенные из фрагментов морфологически неизменной слизистой желудка, взятой у 25 больных на линии резекции – на расстоянии не менее 5 см от макроскопически определяемого края опухоли.

От всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании.

Образцы тканей, полученные при выполнении оперативного вмешательства, помещали в пробирку, содержащую раствор RNA-later, и хранили в течение суток в холодильнике при температуре +4°C, затем переносили в морозильную камеру и хранили при температуре –20°C [12].

Выделение и очистку ДНК проводили методом фенольно-хлороформной экстракции [14].

GLAD-ПЦР-анализ

GLAD-ПЦР-анализ образцов ДНК включал три стадии: 1) гидролиз ДНК ферментом GlaI; 2) лигирование полученных гидролизатов ДНК с универсальным адаптером; 3) последующую ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентного зонда и первого праймера, комплементарных целевому участку ДНК, а также второго праймера, соответствующего последовательности адаптера и участку ДНК вблизи определяемого сайта GlaI (рис. 1).

Для постановки всех этапов GLAD-ПЦР применяли реагенты производства ООО «Сибэнзайм».

Ферментативный гидролиз ДНК проводили в течение 30 мин при 30°C. Реакционная смесь (объемом 21.5 мкл) включала 9.0 нг ДНК исследуемого образца, 1× SE-буфер TMN (10 мМ Трис-НСl (pH 7.9), 5 мМ MgCl₂, 25 мМ NaCl), 2.0% диметилсульфоксида (ДМСО), 2.0 мкг бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 1.5 ед. акт. эндонуклеазы GlaI.

Для лигирования продуктов гидролиза с адаптером (в объеме 30.0 мкл) к каждой пробе добавляли АТФ и универсальный двухцепочечный адаптер (5'-ССТГСТСТТТТСАТСГ-3'/3'-p-GGACGAGAAAGTAGC-p-5') до конечной концентрации каждого 0.5 мкМ и 240 ед. акт. высокоактивной Т4-ДНК-лигазы. Реакцию проводили в течение 15 мин при 25°C.

На заключительной стадии в реакционную смесь вносили компоненты ПЦР до следующих концентраций в конечном объеме 60.0 мкл: 1× SE-буфер GLAD (50 мМ Трис-SO₄ (pH 9.0), 30 мМ KCl, 10 мМ [NH₄]₂SO₄), 3 мМ MgCl₂, смесь dNTP по 0.2 мМ каждого, 0.1 мкг/мкл БСА, соответствующую смесь двух праймеров и зонда по 0.4 мкМ каждого, 0.05 ед. акт.

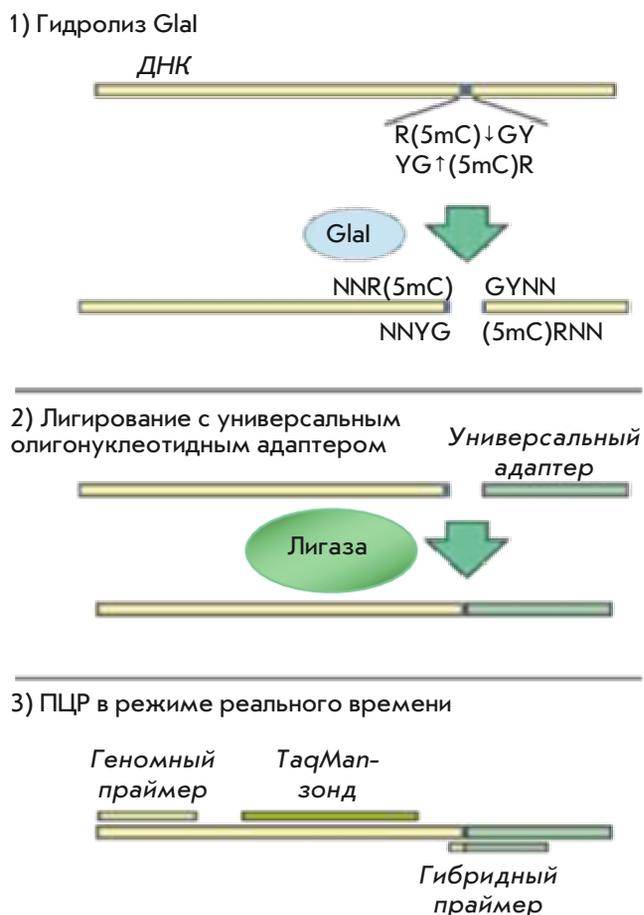


Рис. 1. Схема метода GLAD-ПЦР

SP Taq-ДНК-полимеразы. Для повышения эффективности амплификации GC-богатых участков гена *tfpi2* в ПЦР-смесь дополнительно добавляли ДМСО до концентрации 4%.

Затем по 20.0 мкл полученной смеси переносили в три отдельные микропробирки и проводили ПЦР в режиме реального времени в детектирующем амплификаторе «СХФ-96» (Bio-Rad Lab., США) по программе: 3 мин при 95°C и 45 циклов – 10 с при 95°C, 15 с при 61°C (*bves*, *gata4*, *sox17*, *tcf21*) или при 62°C (*casna2d3*, *galr1*, *hs3st2*, *pcdh10*, *rprm*, *sfrp2*, *wnt5a*), или при 63°C (*cdh11*, *cpeb1*, *fgf2*, *hopx*, *tfpi2*, *zfp82*), 20 с при 72°C. Для устранения влияния возможных начальных флуктуаций на форму кривой амплификации флуоресценцию на первых пяти циклах ПЦР не детектировали.

Подбор специфичных праймеров и зондов

Для подбора специфичных праймеров и зондов анализировали нуклеотидные последовательности, представленные в базе данных GenBank ([\[ncbi.nlm.nih.gov/genbank\]\(http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank\)\), по версии генома человека GRCh38/hg38, семейство программ Vector NTI 11.5 \(Invitrogen, США\) и онлайн-ресурс BLAST \(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>\). Структуры использованных в работе праймеров и зондов приведены в табл. 1.](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

Гибридные праймеры, соответствующие сайтам R(5mC)GY, метилированным с наибольшей частотой, подбирали экспериментально. Каждый такой праймер имеет нуклеотидную последовательность 5'-ССТГСТТТТКАТСГГYNN-3', где 15 5'-концевых нуклеотидов соответствуют адаптеру, а четыре 3'-концевых нуклеотида (подчеркнуты) комплементарны геномной последовательности в точке гидролиза ДНК. В регуляторной области каждого гена с применением гибридных праймеров, соответствующих концевым тетра-нуклеотидам, получаемым после гидролиза последовательности NNR(5mC)↓GYNN, проанализированы все сайты RCGY, расположенные в пределах ~200 п.н. от участка гибридизации флуоресцентного зонда. Наименьшее значение порогового цикла (Cq), получаемое в ПЦР в режиме реального времени, указывало на максимальную степень метилирования сайта R(5mC)GY [12, 13].

Статистический анализ

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программного обеспечения MedCalc 15.11 (MedCalc Software, Бельгия). Исходя из значений Cq образцов ДНК для анализируемых сайтов RCGY получали характеристические кривые (ROC-кривые; Receiver Operating Characteristic Curves) с 95% доверительным интервалом. Величина площади под ROC-кривой (ППК) отображает взаимосвязь чувствительности и специфичности диагностического теста. ППК является интегральным показателем диагностической эффективности сайта-онкомаркера (в «идеальном» тесте ППК = 1) [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение кандидатных генов-онкомаркеров рака желудка

К настоящему времени показано, что развитие РЖ ассоциировано с эпигенетической инактивацией целого ряда генов. По опубликованным данным мы сформировали исходную панель из 23 генов-онкосупрессоров, сайты RCGY в регуляторных областях которых мы исследовали методом GLAD-ПЦР. Эта панель включает гены *brinp1* [16], *bves* [17], *casna2d3* [18], *cdh11* [16], *cpeb1* [19], *epha7*, *fgf2*, *galr1* [16], *gata4* [20], *hopx* [21], *hs3st2* [16], *irx1* [17], *lrrc3b* [22], *pcdh10* [23], *rprm* [24], *runx3*, *sfrp2* [17], *sox17* [25], *tcf21* [26], *tfpi2* [27], *wnt5a* [17], *znf331* [28] и *znf545* [29].

Таблица 1. Структуры праймеров и флуоресцентных зондов, используемых для GLAD-ПЦР-анализа генов-онко-маркеров РЖ

Ген ^а	Кодируемый белковый продукт ^а	Локализация гена в хромосоме ^а	Последовательность первого праймера и флуоресцентного зонда ^б
<i>brinp1</i>	BMP / retinoic acid inducible neural specific 1	9q33.1	FAM-CCGTAAAGTCCCCTTCGCTGGTCCC-BHQ1 GAGCCGGGATTCATGCCTGTC
<i>bves</i>	Blood vessel epicardial substance	6q21	CCGGCGGCATTCGTCTCGTT FAM-CCCTACCCGGACCGCACTTCTCGAA-BHQ1
<i>casna2d3</i>	Calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 3	3p21.1-p14.3	FAM-CGCACTCGGAAAAGCACTAAGAGCCTC-BHQ1 CGAGGGAGAAGGACTGTACCGA
<i>cdh11</i>	Cadherin 11	16q21	CGCTCCAGCTGGCCAGGC FAM-CTTCCCCCAACCACCATCCCCGGC-BHQ1
<i>cpeb1</i>	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1	15q25.2	CTGCCCTGGGCCTCAGTTTCC FAM-CCCCTGCGAGCGGCGGCG-BHQ1
<i>epha7</i>	EPH receptor A7	6q16.1	FAM-CCAAGCACGGAGCCCGACAGTGA-BHQ1 CCCAGCCCCGCGGAGGTTCC
<i>fgf2</i>	Fibroblast growth factor 2	4q28.1	CGGGGTCCGGGAGAAGAGC FAM-CCGACCCGCTCTCTCCGCCTCATT-BHQ1
<i>galr1</i>	Galanin receptor 1	18q23	FAM-TGCAGCAGAGAAGCCCTGGCACC-BHQ1 GGCGAGAGCTCTTTGGGAGGC
<i>gata4</i>	GATA binding protein 4	8p23.1	CCTTCTGGCCGGCCTCCT FAM-AGTCCCTGGACCCAGCCCCGA-BHQ1
<i>hopx</i>	HOP homeobox	4q12	CGGGCAGAAGCGATGGGAGA FAM-CCCGCCGGGCTGCCCTCC-BHQ1
<i>hs3st2</i>	Heparan sulfate-glucosamine 3-sulfotransferase 2	16p12.2	GCCTCCCGGAGGAGTACTATGCC FAM-CACCTTCGTTTACCCGCCCAAAGC-BHQ1
<i>irx1</i>	Iroquois homeobox 1	5p15.33	GCCAGGGAGCGGGTAGCGA FAM-CTCCACGGGCCTGCTTCTGCGG-BHQ1
<i>lrrc3b</i>	Leucine rich repeat containing 3B	3p24.1	FAM-TGCTCACCCCGTGCTGTGCAACTTG-BHQ1 GGGCTGGGGGAAGGCCAA
<i>pcdh10</i>	Protocadherin 10	4q28.3	CCGGCCCTTGATCTCTGGTGC FAM-CCGCCCATCTCTGCTCCACAACG-BHQ1
<i>rprm</i>	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator homolog	2q23.3	CCCCGTTCAAATTCGCAGGC FAM-CCCCCACCCTTCTCCACAATGA-BHQ1
<i>runx3</i>	Runt related transcription factor 3	1p36.11	FAM-CCCTCCCAACTGTAGCCGGCCCC-BHQ1 CTGGGGCGATAATTTCGGAATGA
<i>sfrp2</i>	Secreted frizzled related protein 2	4q31.3	FAM-CTCCCTTGCTCCCCCACCCTCC-BHQ1 CCAGCCCTCCTCGATTACCC
<i>sox17</i>	SRY (sex determining region Y)-Box 17	8q11.23	CGCCCTCCGACCCTCAA FAM-TCCCGGATTCCCCAGGTGGCC-BHQ1
<i>tcf21</i>	Transcription factor 21	6q23.2	FAM-TGCCCCCGACACCAAGCTCTCC-BHQ1 CCAGCCTGAGCGTGTCCAGC
<i>tfpi2</i>	Tissue factor pathway inhibitor 2	7q21.3	CCGAGCGGAGGGGCTCT FAM-AGCGAGTCCCCCTGCCAGCG-BHQ1
<i>wnt5a</i>	Wnt family member 5A	3p14.3	FAM-CCCTTCCCTGCCCTCCCACAGC-BHQ1 CAGGTGTGGGGTGGGAGGA
<i>zfp82</i>	Zinc finger protein 82	19q13.12	FAM-CAGCTGCAGAGAAATGGCCCTCGGTC-BHQ1 CCCCAGCATCCTCTGCCAC
<i>znf331</i>	Zinc finger protein 331	19q13.42	FAM-CCGCACACTCGCTGGCCCTTTCAC-BHQ1 GCCCGATCCCGACCAGTCAC

^аОбозначение, хромосомная локализация генов и наименования конечных белковых продуктов приведены согласно указаниям Международного комитета по номенклатуре генов – HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org>).

^бВ последовательности флуоресцентных зондов FAM – 6-карбоксихлорофлуоресцеин, BHQ1 – Black Hole Quencher 1.

Таблица 2. Сайты RCGY, выбранные для GLAD-ПЦР-анализа, их локализация в геноме и последовательности соответствующих им гибридных праймеров

Ген	Сайт	Координаты сайта ^a	Гибридный праймер ^b
<i>brinp1</i>	GCGC	chr9: 119369161-119369164	CCTGCTCTTTCATCGGCGG
<i>bves</i>	GCGC	chr6:105137614-105137617	CCTGCTCTTTCATCGGCGC
<i>casna2d3</i>	GCGC	chr3:54120898-54120901	CCTGCTCTTTCATCGGCGA
<i>creb1</i>	GCGC	chr15: 82648343-82648347	CCTGCTCTTTCATCGGCGG
<i>epha7</i>	GCGC	chr6:93419955-93419958	CCTGCTCTTTCATCGGCGA
<i>galr1</i>	GCGC	chr18:77249828-77249831	CCTGCTCTTTCATCGGCGG
<i>irx1</i>	GCGC	chr5:3596424-3596427	CCTGCTCTTTCATCGGCGG
<i>lrrc3b</i>	GCGC	chr3:26623493-26623500	CCTGCTCTTTCATCGGCGG
<i>pcdh10</i>	GCGT	chr4:133152953-133152956	CCTGCTCTTTCATCGGCGA
<i>runx3</i>	GCGT	chr1:24931357-24931360	CCTGCTCTTTCATCGGTGG
<i>sfrp2</i>	GCGC	chr4:153789030-15379033	CCTGCTCTTTCATCGGCGC
<i>pcf21</i>	GCGC	chr6:133889653-133889658	CCTGCTCTTTCATCGGCGA
<i>tfpi2</i>	GCGC	chr7:93890478-93890481	CCTGCTCTTTCATCGGCGC
<i>znf331</i>	GCGT	chr19:53521737-53521740	CCTGCTCTTTCATCGGTCT

^a Координаты сайта приведены в соответствии с последней сборкой генома человека GRCh38/hg38.

^b Подчеркнут 3'-концевой тетрауклеотид гибридного праймера, комплементарный последовательности ДНК в точке гидролиза ферментом Glal.

Выявление сайтов RCGY в ДНК из тканей РЖ, перспективных для GLAD-ПЦР-анализа

На первом этапе использовали случайную выборку из 10 препаратов опухолевой ДНК, выделенных из тканей РЖ, с помощью которой отобрали наиболее часто метилированные сайты RCGY в пределах регуляторных областей генов-онкосупрессоров как описано ранее [12, 13].

В качестве критерия отбора сайтов RCGY, перспективных для проведения GLAD-ПЦР-анализа, использовали значение Cq, которое не должно превышать 30 по меньшей мере у одного из 10 образцов. По результатам предварительного анализа для дальнейшего исследования всей коллекции образцов ДНК опухолевых ($n = 29$) и морфологически неизмененных тканей ($n = 25$) больных РЖ отобрали по одному сайту RCGY в составе генов *brinp1*, *bves*, *casna2d3*, *creb1*, *epha7*, *galr1*, *irx1*, *lrrc3b*, *pcdh10*, *runx3*, *sfrp2*, *pcf21*, *tfpi2* и *znf331* (табл. 2).

GLAD-ПЦР-анализ сайтов метилирования в препаратах ДНК из клинических образцов

GLAD-ПЦР-анализ выбранных сайтов RCGY выполняли в трех повторах, каждый из которых содержал 3.0 нг ДНК ($\sim 10^3$ копий исследуемого участка гена). Диаграммы на рис. 2 отображают средние значения Cq для исследованных сайтов.

Результаты анализа сайтов R(5mC)GY в генах *bves*, *casna2d3*, *creb1*, *epha7*, *galr1* и *tfpi2* показывают, что значения Cq (23–27) для большинства образцов опухолевой ДНК в среднем на три и более цикла

ниже значений Cq для соответствующих образцов ДНК из здоровых тканей. В то же время у маркеров *brinp1*, *lrrc3b*, *runx3*, *pcf21* и *znf331* это различие в значении Cq для основной части образцов ДНК невелико (менее 1.5 цикла), что затрудняет их использование для выявления опухолевой ткани из-за возможного перекрытия диапазона стандартных отклонений.

На рис. 3 показаны ROC-кривые, полученные при статистической обработке данных GLAD-ПЦР 14 сайтов RCGY, а в табл. 3 представлены значения рассчитанных параметров. В столбцах 2 и 3 указано количество положительных результатов для опухолевых тканей по каждому гену и соответственно чувствительность определения по данному сайту. В столбцах 4 и 5 приведено число отрицательных результатов при проведении GLAD-ПЦР-анализа образцов ДНК из морфологически неизмененных тканей и соответственно специфичность выявления опухолевой ДНК. В столбце 6 указана величина площади под ROC-кривой (ППК), выраженная в виде доли от всей площади квадрата с указанием стандартной ошибки измерения, а в столбце 7 представлены значения 95% доверительного интервала определения данного параметра.

Статистический анализ результатов GLAD-ПЦР (рис. 3 и табл. 3) показывает, что большинство проверенных маркеров характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью, и позволяет дифференцировать образцы ДНК из опухолевых и нормальных тканей РЖ. Полученные значе-

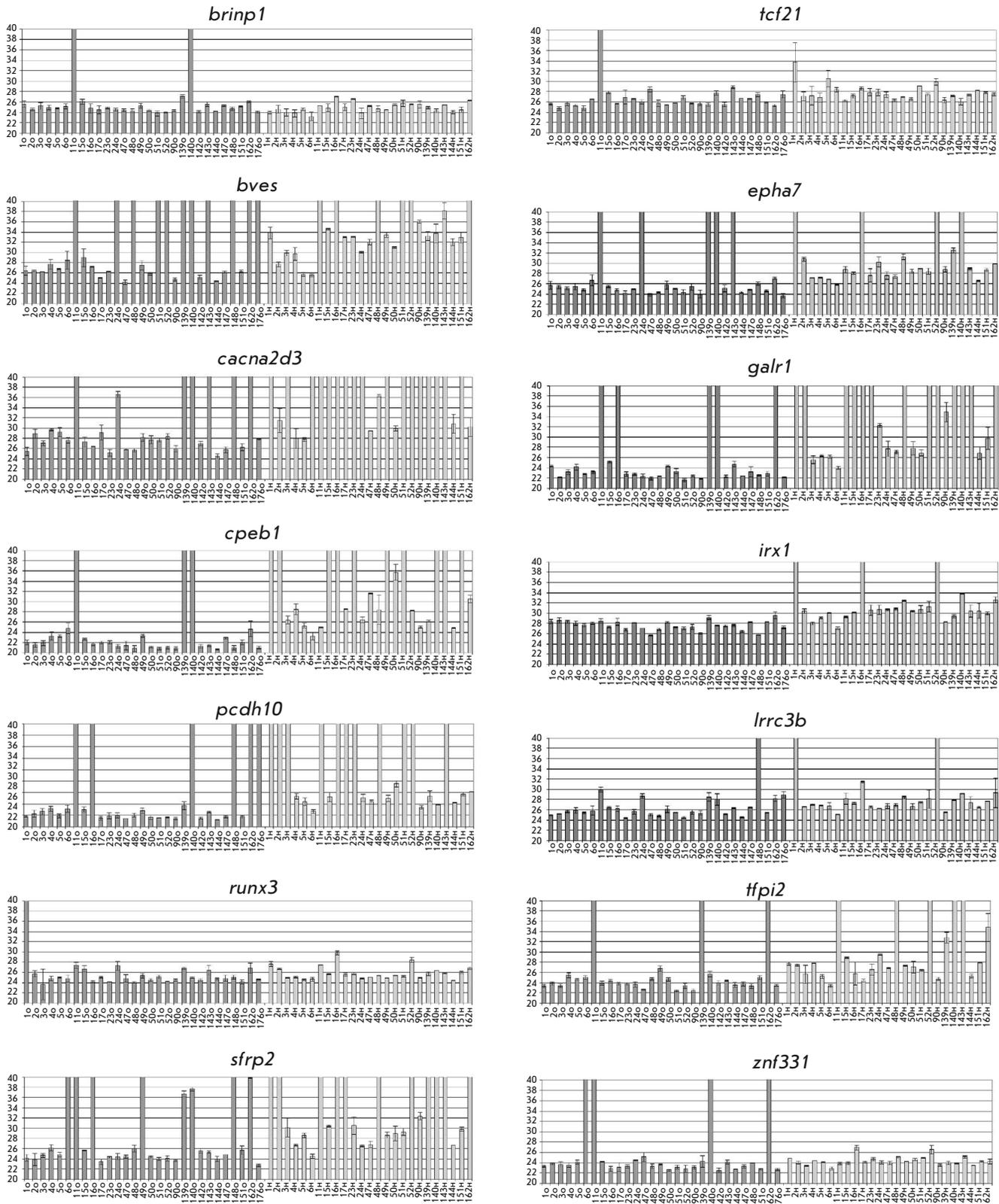


Рис. 2. Результаты GLAD-ПЦР-анализа выбранных R(5mC)GY-сайтов в препаратах ДНК из образцов тканей больных РЖ. По оси ординат приведены значения S_q с диапазонами стандартных отклонений, по оси абсцисс – номера исследованных образцов тканей (о – опухоль, н – неизменная ткань на линии резекции)

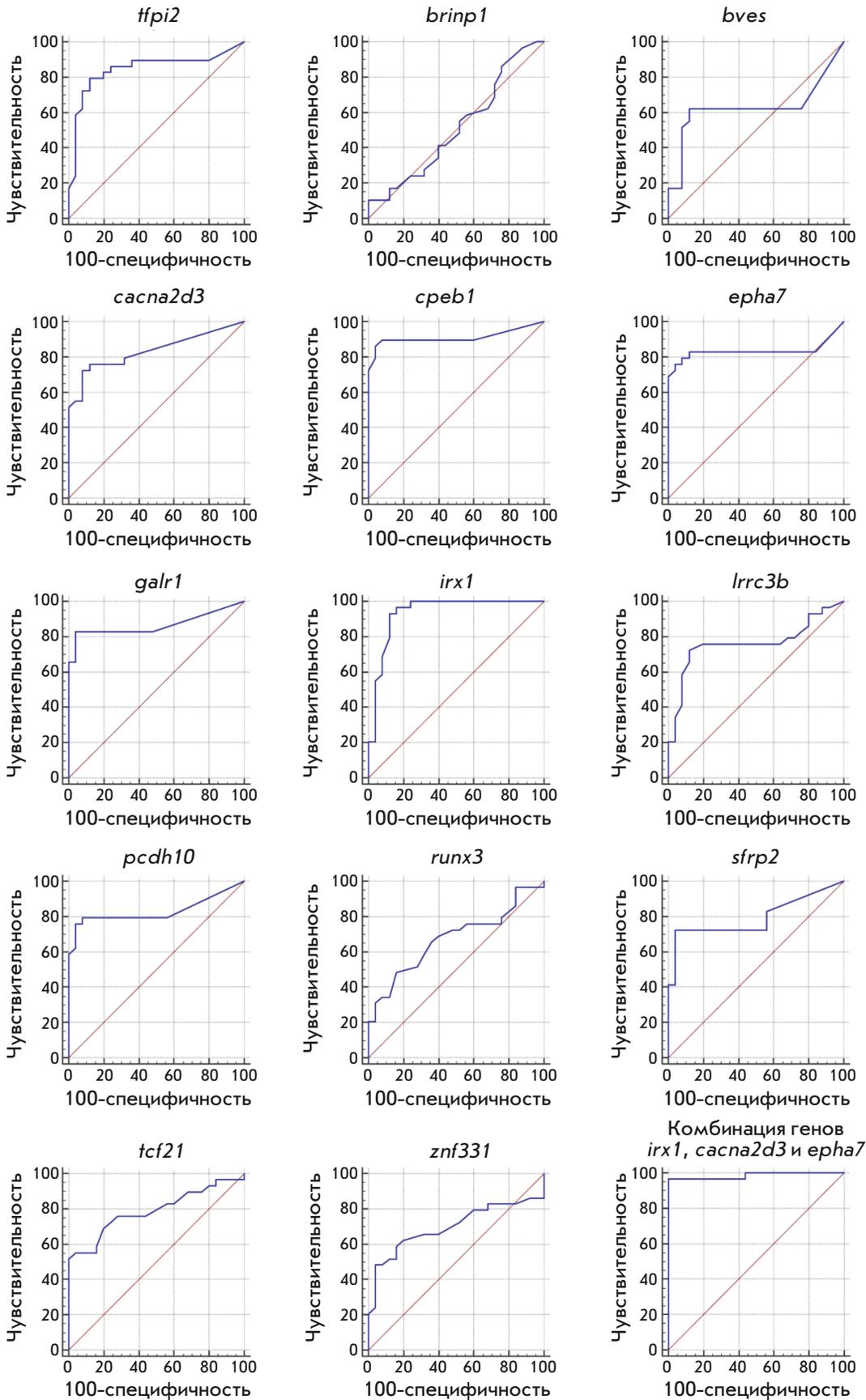


Рис. 3. ROC-кривые, полученные при статистическом анализе данных GLAD-ПЦР-анализа сайтов R(5mC)GY в препаратах ДНК из опухолевых и неизмененных тканей больных РЖ. По оси ординат указана чувствительность в %, по оси абсцисс приведено значение [100 – специфичность (%)]

Таблица 3. Результаты ROC-анализа данных, полученных методом GLAD-ПЦР образцов ДНК из опухолевых и морфологически неизмененных тканей больных РЖ (в порядке уменьшения значений ППК)

Ген	Образцы РЖ, определенные как положительные / общее число образцов РЖ	Чувствительность, %	Образцы морфологически неизмененных тканей, определенных как отрицательные / общее число образцов морфологически неизмененных тканей	Специфичность, %	ППК (стандартная ошибка)	95% доверительный интервал
<i>irx1</i>	27/29	93.1	22/25	88.0	0.934 (0.038)	0.833–0.984
<i>creb1</i>	25/29	86.2	24/25	96.0	0.911 (0.047)	0.802–0.971
<i>galr1</i>	24/29	82.7	24/25	96.0	0.866 (0.054)	0.745–0.943
<i>tfpi2</i>	23/29	79.3	22/25	88.0	0.846 (0.059)	0.721–0.929
<i>casna2d3</i>	21/29	72.4	23/25	92.0	0.834 (0.054)	0.708–0.921
<i>epha7</i>	22/29	75.7	24/25	96.0	0.832 (0.066)	0.706–0.920
<i>pcdh10</i>	22/29	75.9	24/25	96.0	0.830 (0.061)	0.703–0.918
<i>sfrp2</i>	21/29	72.4	24/25	96.0	0.795 (0.064)	0.663–0.893
<i>tcf21</i>	15/29	51.7	25/25	100.0	0.790 (0.063)	0.657–0.889
<i>lrrc3b</i>	21/29	72.4	22/25	88.0	0.762 (0.070)	0.627–0.867
<i>znf331</i>	14/29	48.3	24/25	96.00	0.698 (0.075)	0.558–0.815
<i>runx3</i>	14/29	48.3	21/25	84.0	0.673 (0.074)	0.532–0.795
<i>bves</i>	18/29	62.1	22/25	88.0	0.627 (0.082)	0.485–0.755
<i>brinp1</i>	3/29	10.3	25/25	100.0	0.514 (0.081)	0.374–0.652
Комбинация генов <i>irx1</i> , <i>casna2d3</i> и <i>epha7</i>	28/29	96.6	25/25	100.0	0.985 (0.016)	0.907–1.000

ния ППК (за исключением генов *znf331*, *runx3*, *bves* и *brinp1*) больше 0.7, что, согласно общепринятым критериям оценки данных ROC, свидетельствует о возможности их использования в качестве диагностических моделей [15].

Наиболее высоким диагностическим потенциалом обладают сайты RCGY в составе генов-онкосупрессоров *irx1* и *creb1*: значения ППК для них превышают 0.91.

С применением метода логистической регрессии (алгоритм последовательного включения / исключения) проведена оценка общих диагностических характеристик всех исследованных сайтов RCGY, что позволило отобрать оптимальную комбинацию маркеров, дающую максимальную площадь под ROC-кривой и позволяющую различать образцы ДНК из опухолевых и нормальных тканей с наибольшей эффективностью. Как видно из табл. 3, анализ комбинации маркеров *irx1*, *casna2d3* и *epha7* позволяет проводить такую дифференциацию со 100% специфичностью и чувствительностью 96.6%.

Таким образом, с помощью GLAD-ПЦР-анализа

препаратов ДНК из клинических образцов опухолевых и нормальных тканей больных РЖ сформирована диагностическая панель сайтов RCGY, позволяющая выявлять опухолевые ткани.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известны четыре молекулярных подтипа РЖ, которые различаются профилем метилирования ДНК [17]. В них входят: а) ВЭБ-позитивный, ассоциированный с вирусом Эпштейна–Барр; б) MSI (*mlh1* silencing), характеризующийся функциональной инактивацией локуса *mlh1*; в) вариант со стабильными микросателлитными повторами; г) подтип с большим числом мутаций в микросателлитных повторах. Однако в подавляющем большинстве случаев (> 90%) гистологическим типом РЖ является аденокарцинома.

В настоящее время выявлено значительное количество генов с различными биологическими функциями, районы промотора или первого экзона в которых метилируются при РЖ [30]. При этом метилирование регуляторных областей генов *bves*, *irx1*, *runx3*, *casna2d3*, *lrrc3b* и *sfrp2*, представленных в табл. 3,

ассоциировано по меньшей мере с тремя подтипами РЖ [17]. При исследовании метилирования ДНК на уровне генома используется метод бисульфитной конверсии с последующим секвенированием на NGS-платформе. J.L. Sepulveda и соавт. применили этот подход к исследованию препаратов ДНК из нормальной слизистой и опухолевой ткани и показали существенное увеличение метилирования CpG-динуклеотидов в генах *brinp1*, *epha7* и *galr1* при РЖ [16].

Выводы, сделанные в перечисленных исследованиях, основывались на сравнении медианных значений степени метилирования в выборках образцов тканей без определения частотных показателей метилирования или экспрессии генов для групп «норма» и «опухоль». Такие показатели описаны для остальных пяти генов, представленных в табл. 3.

Выключение гена *creb1* при метилировании промотора наблюдали во всех девяти изученных клеточных линиях РЖ и в 91% первичных опухолей [19]. Похожие результаты получены для гена *pcdh10*, метилирование которого находят в 82% случаев опухолей желудка и в 94% линий опухолевых клеток желудка [23]. Также более чем в 80% образцов опухолей желудка выявлено метилирование промотора гена *tfpi2* [27]. В 71% клеточных линий РЖ установлено выключение гена *znf331*. Этот эффект наблюдали и в значительном количестве образцов ДНК из опухолевых тканей, тогда как в морфологически неизмененных тканях, включая ткань желудка, этот ген не был метилирован [28]. Метилирование промоторной области гена *tcf21* наблюдали только в 65% случаев [26]. Результаты, представленные в табл. 3, хорошо коррелируют с ранее полученными количественными данными по метилированию генов в опухолях РЖ [19, 23, 26–28].

Список генов с aberrантно метилированными сайтами в опухолях РЖ (табл. 3) существенно отличается от списка генов при колоректальном раке, полученного нами ранее [13]. Исключением является ген *sfrp2*, метилирование регуляторной области которого в опухолевой ДНК наблюдается в обоих случаях с практически одинаковой частотой (72% при колоректальном раке).

Возможности GLAD-ПЦР-анализа для диагностики рака желудка

Результаты, полученные в настоящей работе, соответствуют ранее опубликованным данным и по-

казывают, что GLAD-ПЦР позволяет выявлять aberrантно метилированные сайты R(5mC)GY в регуляторных областях генов-онкосупрессоров в образцах ДНК, выделенных из тканей РЖ. При этом степень метилирования сайта связана отрицательной корреляционной зависимостью со значением Cq в ПЦР в режиме реального времени.

Наиболее оптимальным комплексным маркером РЖ оказалась комбинация сайтов RCGY в регуляторных областях генов *irx1*, *casna2d3* и *epha7*. Применение данной панели генов делает специфичность дифференциации опухолевых и морфологически неизмененных тканей равной 100%, а чувствительность анализа при этом повышается до 96.6% (табл. 3).

В настоящее время наиболее перспективным и активно разрабатываемым методом онкодиагностики является так называемая «жидкая биопсия», основанная на анализе свободно циркулирующей ДНК в крови. Один из основных источников такой ДНК при онкологических заболеваниях – опухолевые клетки, разрушающиеся в результате апоптоза и некроза [31]. В дальнейшем планируется провести тестирование подобранной панели эпигенетических маркеров на образцах ДНК из крови больных РЖ с целью разработки чувствительного метода лабораторной диагностики данной онкопатологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом GLAD-ПЦР определены сайты R(5mC)GY, возникающие при aberrантном метилировании регуляторных областей генов-онкосупрессоров в образцах ДНК из тканей РЖ. Предложена панель сайтов в генах *irx1*, *casna2d3* и *epha7*, являющихся эпигенетическими маркерами РЖ, показана высокая диагностическая эффективность этой панели при дифференциации ДНК из морфологически неизмененных и опухолевых тканей. Суммарные показатели чувствительности и специфичности панели составляют 96.6% и 100% соответственно. Мы полагаем, что выбранные сайты RCGY могут использоваться также для разработки систем диагностики РЖ методом GLAD-ПЦР образцов ДНК, выделенных из крови пациентов. ●

Работа проведена при финансовой поддержке гранта фонда Сколково № Г102/16 от 06 декабря 2016 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IARC. / Eds Stewart B.W., Wild C.P. World Cancer Report 2014. Geneva: WHO Press, 2014.
2. IARC. Press release № 263. WHO, Geneva, Switzerland, 2018.

<https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>. Accessed 25 Sep 2019.

3. Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A. // CA Cancer J. Clin. 2014. V. 64. № 1. P. 9–29.

4. Cancer.net. Doctor-approved patient information from ASCO. <https://www.cancer.net/cancer-types/stomach-cancer/statistics>. Accessed 25 Sep. 2019.
5. International medical center ONCLINIC. https://www.onclinic.ru/articles/za_bolevaniya/onkologiya/vyzhivaemost_pri_rake_zheludka. Accessed 25 Sep. 2019.
6. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>. Accessed 25 Sep. 2019.
7. de Cáceres I., Cairns P. // *Clin. Transl. Oncol.* 2007. V. 9. № 7. P. 429–437.
8. Langevin S.M., Kratzke R.A., Kelsey K.T. // *Transl. Res.* 2015. V. 165. № 1. P. 74–90.
9. Handa V., Jeltsch A. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 348. № 5. P. 1103–1112.
10. Tarasova G.V., Nayakshina T.N., Degtyarev S.K. // *BMC Mol. Biol.* 2008. V. 9. P. 7.
11. Кузнецов В.В., Акишев А.Г., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Патент № 2525710 РФ. МПК C12Q 1/68 (2006.01). 2014.
12. Евдокимов А.А., Нетесова Н.А., Сметанникова Н.А., Абдурашитов М.А., Акишев А.Г., Давидович Е.С., Ермолаев Ю.Д., Карпов А.Б., Сазонов А.Э., Тахауов Р.М. и др. // *Вопросы онкологии.* 2016. Т. 62. С. 117–121.
13. Evdokimov A.A., Netesova N.A., Smetannikova N.A., Abdurashitov M.A., Akishev A.G., Malyshev B.S., Davidovich E.S., Fedotov V.V., Kuznetsov V.V., Ermolaev Yu.D., et al. // *Biol. Med. (Aligarh).* 2016. V. 8. P. 342.
14. Смит К., Клко С., Кантор Ч. Анализ генома. Методы. / Под ред. К. Дейвиса. М.: Мир, 1990. 244 с.
15. Pepe M.S. The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction. Oxford: Oxford University Press, 2003. 320 с.
16. Sepulveda J.L., Gutierrez-Pajares J.L., Luna A., Yao Y., Tobias J.W., Thomas S. Woo Y., Giorgi F., Komissarova E.V., et al // *Mod. Pathol.* 2016. V. 29. № 2. P. 182–193.
17. Lim B., Kim J.H., Kim M., Kim S.Y. // *World J. Gastroenterol.* 2016. V. 22. № 3. P. 1190–1201.
18. Yuasa Y., Nagasaki H., Akiyama Y., Hashimoto Y., Takizawa T., Kojima K., Kawano T., Sugihara K., Imai K., Nakachi K. // *Int. J. Cancer.* 2009. V. 124. № 11. P. 2677–2682.
19. Caldeira J., Simoes-Correia J., Paredes J., Pinto M.T., Sousa S., Corso G., Marrelli D., Roviello F., Pereira P.S., Weil D., et al. // *Gut.* 2012. V. 61. № 8. P. 1115–1123.
20. Akiyama Y., Watkins N., Suzuki H., Jair K.W., van Engeland M., Esteller M., Sakai H., Ren C.Y., Yuasa Y., Herman J.G., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. № 23. P. 8429–8439.
21. Ooki A., Yamashita K., Kikuchi S., Sakuramoto S., Katada N., Kokubo K., Kobayashi H., Kim M.S., Sidransky D., Watanabe M. // *Oncogene.* 2010. V. 29. P. 3263–3275.
22. Kim M., Kim J.H., Jang H.R., Kim H.M., Lee C.W., Noh S.M., Song K.S., Cho J.S., Jeong H.Y., Hahn Y., et al. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. P. 7147–7155.
23. Yu J., Cheng Y.Y., Tao Q., Cheung K.F., Lam C.N., Geng H., Tian L.W., Wong Y.P., Tong J.H., Ying J.M., et al. // *Gastroenterology.* 2009. V. 136. № 2. P. 640–651.
24. Wang H., Zheng Y., Lai J., Luo Q., Ke H., Chen Q. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 12. e0168635.
25. Oishi Y., Watanabe Y., Yoshida Y., Sato Y., Hiraishi T., Oikawa R., Maehata T., Suzuki H., Toyota M., Niwa H., et al. // *Tumour Biol.* 2012. V. 33. № 2. P. 383–393.
26. Yang Z., Li D.M., Xie Q., Dai D.Q. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2015. V. 141. № 2. P. 211–220.
27. Jee C.D., Kim M.A., Jung E.J., Kim J., Kim W.H. // *Eur. J. Cancer.* 2009. V. 45. № 7. P. 1282–1293.
28. Yu J., Liang Q.Y., Wang J., Cheng Y., Wang S., Poon T.C., Go M.Y., Tao Q., Chang Z., Sung J.J. // *Oncogene.* 2013. V. 32. № 3. P. 307–317.
29. Wang S., Cheng Y., Du W., Lu L., Zhou L., Wang H., Kang W., Li X., Tao Q., Sung J.J., et al. // *Gut.* 2013. V. 62. № 6. P. 833–841.
30. Qu Y., Dang S., Hou P. // *Clin. Chim. Acta.* 2013. V. 424. P. 53–65.
31. Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. // *Молекуляр. биология.* 2008. Т. 42. № 1. С. 12–23.

УДК 577.113.3.017

Синтез и противовирусные свойства 1-замещенных 3-[ω-(4-оксохиназолин-3(4H)-ил)алкил]-производных урацила

М. П. Парамонова¹, А. Л. Хандажинская^{2*}, А. А. Озеров¹, С. Н. Кочетков², R. Snoeck³, G. Andrei³, М. С. Новиков¹

¹Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, 400131 Россия

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

³Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Herestraat 49 bus 1043, Leuven B-3000, Belgium

*E-mail: khandazhinskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 05.05.2020

Принята к печати 28.05.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10983

РЕФЕРАТ С целью поиска новых противовирусных агентов осуществлен синтез серии производных урацила, содержащих в своем составе 4-оксохиназолиновый фрагмент, связанный с атомом азота N³ пиримидинового кольца коротким метиленовым мостиком. Показано, что некоторые соединения этого ряда проявляют высокую ингибиторную активность в отношении цитомегаловируса человека и вируса ветряной оспы опоясывающего лишая (*varicella zoster virus*) в культуре клеток HEL.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА производные урацила, 4-оксохиназолин, синтез, противовирусная активность, цитомегаловирус человека, вирус ветряной оспы опоясывающего лишая.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HCMV – цитомегаловирус человека; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; VZV – вирус ветряной оспы опоясывающего лишая; ДМФА – диметилформамид.

ВВЕДЕНИЕ

Цитомегаловирус человека (HCMV) относится к подсемейству Betaherpesvirinae семейства Herpesviridae [1]. Одна из ключевых характеристик герпесвирусов, в том числе и HCMV, – способность устанавливать латентную инфекцию, которая может реактивироваться при понижении иммунного статуса [2]. HCMV инфицировано до 90% взрослого городского населения. Спектр заболеваний, связанных с HCMV, варьирует от тяжелой полиорганной системной болезни со значительной заболеваемостью и смертностью до почти бессимптомной инфекции [3]. В группу риска тяжелого протекания инфекции HCMV входят реципиенты трансплантатов, проходящие иммуносупрессивную терапию [4], ВИЧ-инфицированные [5] и дети, инфицированные во время внутриутробного развития [6]. Потеря адаптивного иммунитета у реципиентов трансплантатов и ВИЧ-инфицированных пациентов считается основным фактором риска диссеминированной инфекции HCMV, тогда как незрелость иммунной системы плода предрасполагает, по-видимому, к развитию у инфицированных внутриутробно младенцев тяжелых заболеваний, врожденных уродств и мертворождению [7]. Даже

при широком распространении высокоактивной антиретровирусной терапии у ВИЧ-инфицированных пациентов HCMV ассоциирован с более высоким уровнем смертности, вызванной не СПИДом, а цереброваскулярными и сердечно-сосудистыми заболеваниями [8]. Кроме того, HCMV может быть причиной сосудистых заболеваний у реципиентов трансплантатов [9], а также вызывать такие хронические воспалительные заболевания, как воспалительное заболевание кишечника [10], ускоренное иммунное старение у пожилых людей [11] и развитие злокачественных опухолей [12, 13].

Анти-HCMV-средства, которые в настоящий момент используются в клинике при HCMV-инфекции, включают ганцикловир, цидофовир и фоскарнет [14]. Эти препараты способны ингибировать синтез, катализируемый полимеразой HCMV, и понижать репродукцию вируса у пациентов с клиническими симптомами HCMV-инфекции. Однако эти препараты вызывают множество нежелательных эффектов. В частности, все они проявляют заметную токсичность [15], а также низкую биодоступность, поэтому для достижения необходимого уровня препарата в крови требуется его внутривенное введение. Следует

также отметить, что в случае HCMV-инфекции для достижения положительного результата необходима длительная терапия, что, в свою очередь, приводит к возникновению резистентных вариантов HCMV [16–18]. Недавно одобренные летермовир и марибавир имеют существенно более низкую токсичность, однако длительное их использование для лечения и профилактики HCMV-инфекций также приводит к появлению резистентных вариантов вируса [19, 20]. Следовательно, поиск новых высокоэффективных анти-HCMV-агентов остается актуальным.

Ранее нами был синтезирован ряд 1-[ω-(арилокси)-алкил]-производных урацила, содержащих N-(4-феноксифенил)ацетамидный фрагмент у N³-атома азота пиримидинового кольца. Эти соединения ингибировали репликацию HCMV, VZV [21] и HCV [22]. Замена ацетамидного фрагмента на кумариновый остаток привела к образованию ряда соединений, также эффективно подавляющих репликацию HCMV и VZV [23]. В продолжение исследований по поиску эффективных блокаторов вирусной репликации нами синтезирован ряд производных 1-[ω-(арилокси)-алкил]урацила, содержащих фрагмент хиначолин-3(4H)-она, связанный с N³-атомом азота пиримидинового цикла двух- или триметиленовым мостиком.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все реагенты получены от компаний Sigma Aldrich (США) и Acros Organics (Бельгия) и использованы без предварительной очистки. Безводный ДМФА и изопропанол поставлены фирмой Sigma Aldrich. Безводный 1,2-дихлорэтан и этилацетат получены перегонкой над P₂O₅. ЯМР-спектры были зарегистрированы на спектрометре Bruker Avance 400 (400 МГц для ¹H и 100 МГц для ¹³C) в ДМСО-D₆ с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта. Тонкослойная хроматография (ТСХ) проведена на пластинках Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄ путем элюирования этилацетатом, смесью этилацетат–гексан (1 : 1) или этилацетат–1,2-дихлорэтан (1 : 1) и проявлялись с помощью УФ-лампы VL-6.LC (Франция). Силикагель (Kieselguhr 60–200 мкм, 60 А) использован для колоночной хроматографии. Точки плавления устанавливали в стеклянных капиллярах на Mel-Temp 3.0 (Laboratory Devices Inc., США).

Исходные 3-(ω-бромалкил)-производные хиначолин-3(4H)-онов 4–7 получены в соответствии с ранее описанными методами [24].

Общий метод получения 3-(ω-бромалкил)-производных хиначолин-3(4H)-онов 4–7

Смесь хиначолин-3(4H)-онов 1–3 (27.37 ммоль), 1,2-дибромэтана или 1,3-дибромпропана (0.116 ммоль) и K₂CO₃ (5.0 г, 36.18 ммоль) перемешивали

вали в растворе ДМФА (80 мл) при 70°C в течение 36 ч. Реакционную массу упаривали в вакууме досуха, остаток обрабатывали водой (100 мл), твердый остаток отфильтровывали, сушили при комнатной температуре, очищали при помощи флэш-хроматографии, элюируя этилацетатом. Фракции, содержащие продукт, объединяли и упаривали при пониженном давлении. Остаток перекристаллизовывали из смеси этилацетат–гексан (1 : 2).

3-(2-Бромэтил)хиначолин-3(4H)-он (4). Выход 58%, T_{пл} 109.5–111°C, R_f 0.26 (этилацетат–гексан, 1 : 1). ¹H-ЯМР-спектр (ДМСО-D₆), δ, м.д., J (Гц): 3.86 (2H, т, J = 6.3, BrCH₂), 4.40 (2H, т, J = 6.3, NCH₂), 7.55 (1H, дт, J = 7.2 и 1.1, H-5), 7.69 (1H, д, J = 8.1, H-8), 7.84 (1H, дт, J = 8.6 и 1.6, H-7), 8.17 (1H, дд, J = 9.0 и 1.1, H-6), 8.43 (1H, с, H-2). ¹³C-ЯМР (75 МГц, ДМСО-D₆), δ, м.д.: 31.1, 47.9, 121.8, 126.5, 127.5, 127.7, 135.0, 148.1, 148.4, 160.6.

3-(3-Бромпропил)хиначолин-3(4H)-он (5). Выход 59%, T_{пл} 111–112.5°C, R_f 0.22 (этилацетат–гексан, 1 : 1). ¹H-ЯМР-спектр (ДМСО-D₆), δ, м.д., J (Гц): 2.27 (2H, кв, J = 6.8, CH₂), 3.57 (2H, т, J = 6.5, BrCH₂), 4.09 (2H, т, J = 7.0, NCH₂), 7.53 (1H, дт, J = 7.0 и 1.0, H-5), 7.66 (1H, д, J = 8.1, H-8), 7.81 (1H, дт, J = 7.0 и 1.4, H-7), 8.15 (1H, дд, J = 7.9 и 1.2, H-6), 8.35 (1H, с, H-2); ¹³C-ЯМР (75 МГц, ДМСО-D₆), δ, м.д.: 31.4, 45.0, 121.6, 126.0, 126.9, 127.1, 134.2, 147.9, 160.2.

3-(2-Бромэтил)-6-метилхиначолин-3(4H)-он (6). Выход 52%, T_{пл} 157.5–159°C, R_f 0.27 (этилацетат–гексан, 1 : 1). ¹H-ЯМР-спектр (ДМСО-D₆), δ, м.д., J (Гц): 2.44 (3H, с, CH₃), 3.85 (2H, т, J = 6.3, BrCH₂), 4.39 (2H, т, J = 6.2, NCH₂), 7.58 (1H, д, J = 8.3, H-7), 7.65 (1H, дд, J = 8.4 и 2.0, H-8), 7.95 (1H, т, J = 0.8, H-5), 8.37 (1H, с, H-2). ¹³C-ЯМР (75 МГц, ДМСО-D₆), δ, м.д.: 21.3, 31.1, 40.6, 47.9, 125.9, 127.3, 136.2, 136.3, 137.5, 146.0, 147.7.

3-(2-Бромэтил)-7-хлорхиначолин-3(4H)-он (7). Выход 63%, T_{пл} 138.5–140°C, R_f 0.41 (этилацетат–гексан, 1 : 1). ¹H-ЯМР-спектр (ДМСО-D₆), δ, м.д., J (Гц): 3.81 (2H, т, J = 6.3, BrCH₂), 4.36 (2H, т, J = 6.2, NCH₂), 7.56 (1H, дд, J = 8.5 и 1.9, H-5), 7.72 (1H, д, J = 1.7, H-8), 8.13 (1H, д, J = 8.6, H-6), 8.41 (1H, с, H-2); ¹³C-ЯМР (75 МГц, ДМСО-D₆), δ, м.д.: 30.5, 47.4, 120.2, 126.4, 127.4, 128.1, 139.2, 148.9, 149.3, 159.6.

Общий метод получения 1-[ω-(4-бромфенокси)-алкил]-3-[ω'-(4-оксохиначолин-3(4H)-ил)алкил]-производных урацила 9–18.

Суспензию 1-[ω-(4-бромфенокси)алкил]-производного урацила 8 (1.538 ммоль) и K₂CO₃ (0.3 г, 2.171 ммоль) перемешивали в растворе ДМФА (10 мл) при 80°C в течение 1 ч, добавляли бромид 4–7

(1.541 ммоль), и полученную смесь перемешивали при той же температуре в течение 24 ч. Реакционную массу упаривали в вакууме, остаток обрабатывали водой (100 мл), твердый остаток отфильтровывали, сушили при комнатной температуре, чистили при помощи флэш-хроматографии, элюируя этилацетатом, фракции, содержащие продукт, объединяли и упаривали при пониженном давлении, остаток перекристаллизовывали из смеси этилацетат–1,2-дихлорэтан (1 : 1).

1-[3-(4-Бромфенокси)пропил]-3-[2-(4-оксохиназолин-3(4H)-ил)этил]урацил (9). Выход 78%, $T_{\text{пл}}$ 178.5–179.5°C, R_f 0.45 (1,2-дихлорэтан–MeOH, 10 : 1). ^1H -ЯМР-спектр (DMCO- D_6), δ , м.д., J (Гц): 1.82 (2H, кв, $J = 6.3$, CH_2), 3.72 (2H, т, $J = 6.6$, N^1CH_2), 3.86 (2H, т, $J = 6.2$, OCH_2), 4.15–4.20 (4H, м, $\text{CH}_2 \times 2$), 5.52 (1H, д, $J = 7.8$, H^5), 6.83 (2H, д, $J = 9.1$, $\text{H}-3'$, $\text{H}-5'$), 7.40 (2H, д, $J = 9.0$, $\text{H}-2'$, $\text{H}-6'$), 7.45 (1H, дт, $J = 7.6$ и 1.0 , $\text{H}-5''$), 7.54 (1H, д, $J = 7.9$, H^6), 7.58 (1H, д, $J = 8.1$, $\text{H}-8''$), 7.74 (1H, дт, $J = 7.7$ и 1.5 , $\text{H}-7''$), 8.03 (1H, дд, $J = 8.0$ и 1.2 , $\text{H}-6''$), 8.18 (1H, с, $\text{H}-2''$); ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMCO- D_6), δ , м.д.: 27.8, 44.4, 46.9, 65.5, 100.4, 112.5, 117.3, 121.9, 126.5, 127.3, 127.6, 132.6, 134.6, 145.0, 148.2, 151.6, 158.1, 161.1, 163.0.

1-[4-(4-Бромфенокси)бутил]-3-[2-(4-оксохиназолин-3(4H)-ил)этил]урацил (10). Выход 76%, $T_{\text{пл}}$ 191–192°C, R_f 0.45 (1,2-дихлорэтан–MeOH, 10 : 1). ^1H -ЯМР-спектр (DMCO- D_6), δ , м.д., J (Гц): 1.47–1.56 (4H, м, $\text{CH}_2 \times 2$), 3.59 (2H, т, $J = 6.3$, N^1CH_2), 3.81 (2H, т, $J = 6.0$, OCH_2), 4.17–4.22 (4H, м, $\text{CH}_2 \times 2$), 5.57 (1H, д, $J = 7.9$, H^5), 6.84 (2H, д, $J = 9.0$, $\text{H}-3'$, $\text{H}-5'$), 7.40 (2H, д, $J = 9.0$, $\text{H}-2'$, $\text{H}-6'$), 7.42 (1H, дт, $J = 7.2$ и 1.2 , $\text{H}-5''$), 7.56 (1H, д, $J = 8.1$, $\text{H}-8''$), 7.61 (1H, д, $J = 7.9$, H^6), 7.71 (1H, дт, $J = 7.7$ и 1.5 , $\text{H}-7''$), 8.04 (1H, дд, $J = 8.0$ и 1.1 , $\text{H}-6''$), 8.17 (1H, с, $\text{H}-2''$); ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMCO- D_6), δ , м.д.: 25.2, 25.8, 44.4, 48.9, 67.8, 100.4, 112.3, 117.2, 121.9, 126.5, 127.2, 127.5, 132.6, 134.5, 144.9, 148.2, 148.3, 151.7, 158.3, 161.1, 162.9.

1-[5-(4-Бромфенокси)пентил]-3-[2-(4-оксохиназолин-3(4H)-ил)этил]урацил (11). Выход 73%, $T_{\text{пл}}$ 174.5–176°C, R_f 0.47 (1,2-дихлорэтан–MeOH, 10 : 1). ^1H -ЯМР-спектр (DMCO- D_6), δ , м.д., J (Гц): 1.23 (2H, кв, $J = 5.6$, CH_2), 1.38 (2H, кв, $J = 7.0$, CH_2), 1.58 (2H, кв, $J = 7.3$, CH_2), 3.54 (2H, т, $J = 7.1$, N^1CH_2), 3.86 (2H, т, $J = 6.2$, OCH_2), 4.16–4.20 (4H, м, $\text{CH}_2 \times 2$), 5.55 (1H, д, $J = 7.9$, H^5), 6.85 (2H, д, $J = 9.0$, $\text{H}-3'$, $\text{H}-5'$), 7.39 (2H, д, $J = 9.0$, $\text{H}-2'$, $\text{H}-6'$), 7.44 (1H, дт, $J = 7.5$ и 1.2 , $\text{H}-5''$), 7.55–7.60 (2H, м, H^6 , $\text{H}-8''$), 7.71 (1H, дт, $J = 7.9$ и 1.6 , $\text{H}-7''$), 8.05 (1H, дд, $J = 7.9$, 1.5 и 0.4 , $\text{H}-6''$), 8.16 (1H, с, $\text{H}-2''$); ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMCO- D_6), δ , м.д.: 22.6, 28.2, 28.5, 44.4, 49.1, 68.0, 100.4, 112.2, 117.3, 122.0, 126.5,

127.2, 127.5, 132.6, 134.5, 144.9, 148.2, 148.4, 151.6, 158.4, 161.0, 162.3.

1-[6-(4-Бромфенокси)гексил]-3-[2-(4-оксохиназолин-3(4H)-ил)этил]урацил (12). Выход 78%, $T_{\text{пл}}$ 178.5–179.5°C, R_f 0.48 (1,2-дихлорэтан–MeOH, 10 : 1). ^1H -ЯМР-спектр (DMCO- D_6), δ , м.д., J (Гц): 1.32 (2H, кв, $J = 6.5$, CH_2), 1.58–1.70 (4H, м, $\text{CH}_2 \times 2$), 1.94 (2H, кв, $J = 7.1$, CH_2), 3.68 (2H, т, $J = 7.1$, N^1CH_2), 3.84 (2H, т, $J = 7.0$, OCH_2), 3.87–3.98 (4H, м, $\text{CH}_2 \times 2$), 5.64 (1H, д, $J = 7.9$, H^5), 6.81 (2H, д, $J = 9.0$, $\text{H}-3'$, $\text{H}-5'$), 7.35 (2H, д, $J = 9.0$, $\text{H}-2'$, $\text{H}-6'$), 7.49 (1H, дт, $J = 7.5$ и 1.2 , $\text{H}-5''$), 7.58 (1H, дд, $J = 7.6$ и 0.5 , $\text{H}-8''$), 7.65 (1H, д, $J = 7.9$, H^6), 7.78 (1H, дт, $J = 7.8$ и 1.7 , $\text{H}-7''$), 8.05 (1H, дд, $J = 8.0$ и 1.1 , $\text{H}-6''$), 8.37 (1H, с, $\text{H}-2''$); ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMCO- D_6), δ , м.д.: 22.8, 27.5, 28.5, 28.6, 38.2, 44.5, 48.9, 68.0, 100.6, 112.2, 117.2, 122.0, 126.5, 127.4, 127.6, 132.5, 134.6, 144.6, 148.4, 151.5, 158.4, 160.6, 162.9.

1-[8-(4-Бромфенокси)октил]-3-[2-(4-оксохиназолин-3(4H)-ил)этил]урацил (13). Выход 77%, $T_{\text{пл}}$ 171.5–173°C, R_f 0.33 (этилацетат). ^1H -ЯМР-спектр (300 МГц, DMCO- D_6), δ , м.д., J (Гц): 1.15–1.36 (10H, м, $\text{CH}_2 \times 5$), 1.68 (2H, кв, $J = 7.1$, CH_2), 3.54 (2H, т, $J = 6.9$, N^1CH_2), 3.94 (2H, т, $J = 6.3$, OCH_2), 4.23 (4H, с, $\text{CH}_2 \times 2$), 5.60 (1H, д, $J = 7.8$, H^5), 6.89 (2H, д, $J = 8.6$, $\text{H}-3'$, $\text{H}-5'$), 7.42 (2H, д, $J = 8.6$, $\text{H}-2'$, $\text{H}-6'$), 7.49 (1H, т, $J = 7.5$, $\text{H}-5''$), 7.61–7.64 (2H, м, $\text{H}-8''$, H^6), 7.78 (1H, т, $J = 7.5$, $\text{H}-7''$), 8.09 (1H, д, $J = 7.8$, $\text{H}-6''$), 8.20 (1H, с, $\text{H}-2''$). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMCO- D_6), δ , м.д.: 25.8, 26.0, 28.4, 29.0, 40.6, 44.4, 49.2, 68.2, 100.3, 112.2, 117.2, 121.9, 126.5, 127.2, 127.5, 132.5, 134.5, 144.9, 148.2, 151.6, 158.4, 161.0, 162.9.

1-[10-(4-Бромфенокси)децил]-3-[2-(4-оксохиназолин-3(4H)-ил)этил]урацил (14). Выход 80%, $T_{\text{пл}}$ 161–162°C, R_f 0.38 (этилацетат). ^1H -ЯМР-спектр (300 МГц, DMCO- D_6), δ , м.д., J (Гц): 1.15–1.40 (14H, м, $\text{CH}_2 \times 7$), 1.70 (2H, кв, $J = 7.3$, CH_2), 3.54 (2H, т, $J = 7.1$, N^1CH_2), 3.94 (2H, т, $J = 6.5$, OCH_2), 4.20–4.24 (4H, м, $\text{CH}_2 \times 2$), 5.60 (1H, д, $J = 7.8$, H^5), 6.90 (2H, д, $J = 9.1$, $\text{H}-3'$, $\text{H}-5'$), 7.43 (2H, д, $J = 9.0$, $\text{H}-2'$, $\text{H}-6'$), 7.50 (1H, т, $J = 7.0$, $\text{H}-5''$), 7.62 (1H, д, $J = 7.5$, $\text{H}-8''$), 7.64 (1H, д, $J = 7.9$, H^6), 7.77 (1H, дт, $J = 8.6$ и 1.6 , $\text{H}-7''$), 8.09 (1H, дд, $J = 7.9$ и 1.1 , $\text{H}-6''$), 8.21 (1H, с, $\text{H}-2''$); ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMCO- D_6), δ , м.д.: 25.9, 26.1, 28.4, 28.96, 29.02, 29.16, 29.22, 29.3, 44.4, 49.2, 68.2, 100.3, 112.2, 117.2, 121.9, 126.5, 127.2, 127.5, 132.5, 134.5, 144.9, 148.2, 148.3, 151.6, 158.4, 161.0, 163.0.

1-[12-(4-Бромфенокси)додэцил]-3-[2-(4-оксохиназолин-3(4H)-ил)этил]урацил (15). Выход 73%, $T_{\text{пл}}$ 150–152°C, R_f 0.39 (этилацетат). ^1H -ЯМР-спектр (300 МГц, DMCO- D_6), δ , м.д., J (Гц): 1.17–1.41 (18H, м,

CH₂ × 9), 1.70 (2H, кв, *J* = 7.6, CH₂), 3.56 (2H, т, *J* = 7.3, N¹CH₂), 3.95 (2H, т, *J* = 6.5, OCH₂), 4.21–4.26 (4H, м, CH₂ × 2), 5.58 (1H, д, *J* = 7.9, H⁵), 6.89 (2H, д, *J* = 9.0, H-3', H-5'), 7.41 (2H, д, *J* = 9.0, H-2', H-6'), 7.49 (1H, дт, *J* = 7.1 и 1.1, H-5''), 7.60 (1H, д, *J* = 7.8, H-8''), 7.62 (1H, д, *J* = 7.9, H⁶), 7.78 (1H, дт, *J* = 8.5 и 1.6, H-7''), 8.11 (1H, дд, *J* = 7.9 и 1.2, H-6''), 8.17 (1H, с, H-2''); ¹³C-ЯМР (75 МГц, ДМСО-D₆), δ, м.д.: 25.9, 26.2, 28.5, 29.0, 29.15, 29.24, 29.3, 44.4, 49.2, 68.4, 100.4, 112.2, 117.3, 122.0, 126.5, 127.2, 127.5, 132.5, 134.4, 144.8, 148.1, 148.4, 151.6, 158.6, 161.0, 162.9.

1-[5-(4-Бромфенокси)пентил]-3-[2-(7-хлор-4-оксохиназолин-3(4H)-ил)этил]урацил (16). Выход 82%, *T*_{пл} 154–155°C, *R*_f 0.59 (1,2-дихлорэтан–MeOH, 10 : 1). ¹H-ЯМР-спектр (ДМСО-D₆), δ, м.д., *J* (Гц): 1.24 (2H, кв, *J* = 8.0, CH₂), 1.37 (2H, кв, *J* = 7.5, CH₂), 1.59 (2H, кв, *J* = 7.6, CH₂), 3.55 (2H, т, *J* = 7.3, N¹CH₂), 3.88 (2H, т, *J* = 6.5, OCH₂), 4.17–4.20 (4H, м, CH₂ × 2), 5.57 (1H, д, *J* = 7.8, H⁵), 6.87 (2H, д, *J* = 8.9, H-3', H-5'), 7.40 (2H, д, *J* = 8.9, H-2', H-6'), 7.49 (1H, дд, *J* = 8.5 и 1.9, H-5''), 7.61 (1H, д, *J* = 7.9, H⁶), 7.65 (1H, д, *J* = 1.8, H-8''), 8.05 (1H, д, *J* = 8.6, H-6), 8.25 (1H, с, H-2''); ¹³C-ЯМР (75 МГц, ДМСО-D₆), δ, м.д.: 22.1, 27.7, 28.1, 44.1, 48.6, 67.5, 99.8, 111.7, 116.7, 120.2, 126.2, 127.1, 128.1, 132.1, 138.8, 144.5, 148.9, 149.2, 151.1, 157.9, 160.0, 162.4.

1-[5-(4-Бромфенокси)пентил]-3-[3-(4-оксохиназолин-3(4H)-ил)пропил]урацил (17). Выход 87%, *T*_{пл} 103.5–104.5°C, *R*_f 0.48 (1,2-дихлорэтан–MeOH, 10 : 1). ¹H-ЯМР-спектр (ДМСО-D₆), δ, м.д., *J* (Гц): 1.31 (2H, кв, *J* = 5.6, CH₂), 1.36–1.70 (4H, м, CH₂ × 2), 1.94 (2H, кв, *J* = 7.0, CH₂), 3.68 (2H, т, *J* = 7.1, N¹CH₂), 3.81–3.91 (4H, м, CH₂ × 2), 3.95 (2H, т, *J* = 7.3, OCH₂), 5.64 (1H, д, *J* = 7.9, H⁵), 6.81 (2H, д, *J* = 9.0, H-3', H-5'), 7.34 (2H, д, *J* = 9.0, H-2', H-6'), 7.48 (1H, дт, *J* = 7.5 и 1.1, H-5''), 7.61 (1H, дд, *J* = 7.6 и 0.5, H-8''), 7.64 (1H, д, *J* = 7.9, H⁶), 7.77 (1H, дт, *J* = 7.7 и 1.6, H-7''), 8.05 (1H, дд, *J* = 8.0 и 1.1, H-6''), 8.37 (1H, с, H-2''); ¹³C-ЯМР (75 МГц, ДМСО-D₆), δ, м.д.: 22.8, 27.5, 28.5, 28.6, 38.3, 44.5, 49.0, 68.0, 100.6, 112.2, 117.2, 122.0, 126.5, 127.4, 127.6, 132.5, 134.6, 144.6, 148.4, 151.5, 158.4, 160.6, 162.9.

1-[5-(4-Бромфенокси)пентил]-3-[2-(6-метил-4-оксохиназолин-3(4H)-ил)этил]урацил (18). Выход 79%, *T*_{пл} 180–181.5°C, *R*_f 0.29 (этилацетат). ¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО-D₆), δ, м.д., *J* (Гц): 1.28 (2H, кв, *J* = 6.5, CH₂), 1.39 (2H, кв, *J* = 6.8, CH₂), 1.60 (2H, кв, *J* = 7.2, CH₂), 2.40 (3H, с, CH₃), 3.58 (2H, т, *J* = 7.1, N¹CH₂), 3.89 (2H, т, *J* = 6.4, OCH₂), 4.21 (4H, м, CH₂ × 2), 5.61 (1H, д, *J* = 7.8, H⁵), 6.89 (2H, д, *J* = 9.1, H-3', H-5'), 7.44 (2H, д, *J* = 9.0, H-2', H-6'), 7.51 (1H, д, *J* = 8.3, H-7''), 7.58 (1H, дд, *J* = 8.3 и 1.9, H-8''), 7.64 (1H, д, *J* = 7.9, H⁶), 7.88 (1H, с, H-5''), 8.15 (1H, с, H-2''); ¹³C-ЯМР (75 МГц,

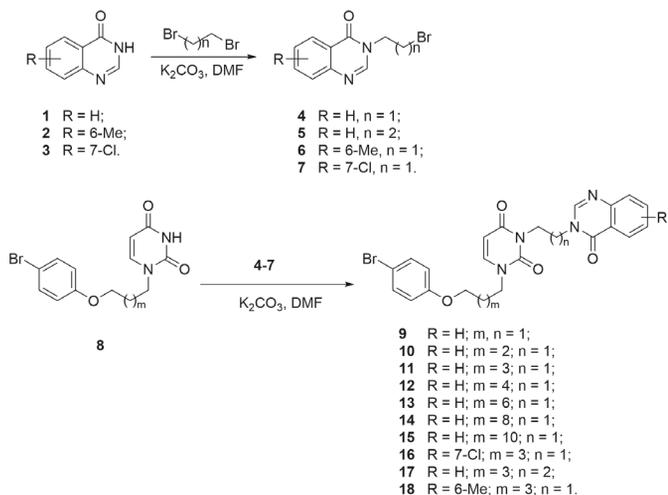
ДМСО-D₆), δ, м.д.: 21.2, 22.6, 28.2, 28.5, 44.3, 49.1, 67.9, 100.3, 112.2, 117.2, 121.7, 125.8, 127.4, 132.6, 135.8, 137.0, 144.9, 146.3, 147.4, 151.6, 158.4, 161.0, 162.9.

Противовирусные исследования

Активность соединений оценивали в отношении цитомегаловируса человека (HCMV, штаммы AD-169 и Davis) и вируса ветряной оспы (VZV, штаммы ОКА и YS). Противовирусные исследования были основаны на ингибировании цитопатического эффекта, вызванного вирусом, или образовании бляшек в культуре клеток легкого эмбриона человека (HEL). Культуры клеток в 96-луночных планшетах для микротитрования инокулировали 100 ССID₅₀ вируса (1 ССID₅₀ – доза вируса, необходимая для заражения 50% клеточных культур) или 10, или 100 бляшкообразующими единицами (PFU) в присутствии различных концентраций испытуемых соединений. Цитопатичность вируса или образование бляшек регистрировали в культурах клеток, инфицированных контрольным вирусом, которые не обрабатывали тестируемыми соединениями. Противовирусную активность выражали в виде концентрации ЕС₅₀ соединения, необходимой для снижения цитопатического эффекта, вызванного вирусом, или образования вирусных бляшек на 50% клеток.

Исследования цитостатической активности

Все исследования проводили в 96-луночных планшетах для микротитрования. В каждую лунку добавляли (5–7.5) × 10⁴ опухолевых клеток и заданное количество испытуемого соединения. Клеткам позволяли пролиферировать в течение 48 ч при 37°C в увлажненной атмосфере CO₂. В конце инкубационного периода клетки подсчитывали в счетчике Коултера. IC₅₀ (50% ингибирующая концентрация) определяли как концентрацию соединения, которая снижала пролиферацию клеток на 50%.



РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез ряда соединений, представленный на *схеме*, заключался в получении исходных 3-(ω-бромалкил)-производных хиназолин-3(4H)-онов 4–7 в соответствии с ранее описанным методом [24]. Соединения 4–7 образовывались при обработке хиназолин-3(4H)-онов 1–3 4-кратным мольным избытком 1,2-дибромэтана или 1,3-дибромпропана в растворе ДМФА в присутствии K₂CO₃, что вело к соответствующим бромидам 4–7, выход которых находился в пределах 52–63%. 1-[ω-(4-Бромфенокси)алкил]-производные урацила, описанные нами ранее [25], обрабатывали бромидами 4–7 в растворе ДМФА и в присутствии K₂CO₃, что вело к получению целевых 3-[ω-(4-оксохиназолин-3(4H)-ил)алкил]-производных урацила 9–18, выход которых составил 73–87%.

Противовирусные свойства 3-[ω-(4-оксохиназолин-3(4H)-ил)алкил]-производных урацила 9–18 в отношении цитомегаловируса (HCMV, штаммы AD-169 и Davis) и вируса ветряной оспы (VZV, штаммы ОКА и 07-1) были изучены в культуре HEL-клеток. Результаты исследования представлены в *таблице*. Обнаружено, что соединение 17 проявило заметную анти-HCMV-активность: оно блокировало репликацию вируса в концентрации (EC₅₀) 7.31 (штамм AD-169) и 5.23 мкМ (штамм Davis). Однако

любая модификация структуры – изменение длины мостика *m*: увеличение (соединения 12–15), уменьшение (соединения 9, 10); уменьшение длины мостика *n* (соединение 11) или введение в хиназолиновый фрагмент заместителей (соединения 16, 18) вело к полной потере ингибиторных свойств в отношении HCMV (см. *таблицу*). Соединение 17 также проявило некоторую ингибиторную активность в отношении вируса ветряной оспы (VZV) и подавляло репликацию обоих штаммов VZV в концентрации (EC₅₀) 28.96 мкМ. Остальные соединения оказались неактивными (см. *таблицу*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами обнаружен эффективный ингибитор репликации HCMV и VZV в клеточной культуре, содержащий в своем составе 4-оксохиназолиновый фрагмент, связанный с остатком урацила цепочкой из трех метиленовых групп. Соединение 17 может служить основой для целенаправленного поиска анти-HCMV-средств. ●

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-015-00094 А). Биологическая часть работы поддержана KU Leuven.

Анти-HCMV-активность производных 3-[ω-(4-оксохиназолин-3(4H)-ил)алкил]урацила 9–18 в культуре клеток HEL

Соединение	Антивирусная активность, EC ₅₀ /мкМ ^a				Цитотоксичность	
	HCMV AD-169	HCMV Davis	VZV ОКА, ТК ⁺	VZV 07-1, ТК ⁻	Морфология клеток МСС/мкМ ^b	Рост клеток СС ₅₀ /мкМ ^c
9	> 100	> 100	> 100	> 100	100	-
10	> 20	> 100	> 20	> 100	20	-
11	> 20	> 20	> 20	> 100	100	-
12	> 100	> 20	> 100	> 100	100	-
13	100	> 100	> 100	> 100	> 100	12.8
14	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
15	> 100	> 100	> 100	> 100	≥ 100	> 100
16	> 20	> 20	> 20	> 100	20	-
17	7.31	5.23	28.96	28.96	20	1.81
18	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
Ганцикловир	2.4	2.01	-	-	350	196.41
Цидофовир	0.38	0.38	-	-	300	129.43
Ацикловир	-	-	1.6	30.37	> 440	> 100
Бривудин	-	-	0.039	6.04	> 300	> 100

^a Эффективная концентрация, необходимая для снижения образования бляшек вируса на 50%.

^b Минимальная цитотоксическая концентрация, которая вызывает микроскопически детектируемые изменения морфологии клеток.

^c Цитотоксическая концентрация, необходимая для снижения клеточного роста на 50%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cytomegaloviruses. From molecular pathogenesis to intervention. / Eds Reddehase M.J., Lemmermann N.A.W. Norfolk: Caister Academic Press, 2013.
2. Griffiths P.D. // *J. Virol. Methods*. 1988. V. 21. P. 79–86.
3. Zanghellini F., Boppana S.B., Emery V.C., Griffiths P.D., Pass R.F. // *J. Infect. Dis*. 1999. V. 180. P. 702–707.
4. Fehr T., Cippà P.E., Mueller N.J. // *Transpl. Int*. 2015. V. 28. P. 1351–1356.
5. Gianella S., Letendre S. // *J. Infect. Dis*. 2016. V. 214. Suppl. 2. P. S67–S74.
6. Griffiths P., Baraniak I., Reeves M. // *J. Pathol*. 2015. V. 235. P. 288–297.
7. Pereira L. // *J. Infect. Dis*. 2011. V. 203. P. 1510–1512.
8. Lichtner M., Cicconi P., Vita S., Cozzi-Lepri A., Galli M., Lo Caputo S., Saracino A., De Luca A., Moioli M., Maggiolo F., et al. // *J. Infect. Dis*. 2015. V. 211. P. 178–186.
9. Weis M., Kledal T.N., Lin K.Y., Panchal S.N., Gao S.Z., Valantine H.A., Mocarski E.S., Cooke J.P. // *Circulation*. 2004. V. 109. P. 500–505.
10. Pillet S., Pozzetto B., Roblin X. // *World J. Gastroenterol*. 2016. V. 22. P. 2030–2045.
11. Effros R.B. // *Mech. Ageing. Dev*. 2016. V. 158. P. 46–52.
12. Herbein G. // *Viruses*. 2018. V. 10. P. 408.
13. Elgert P.A., Yee-Chang M., Simsir A. // *Diagn. Cytopathol*. 2018. V. 46. P. 593–599.
14. Ahmed A. // *Infect. Disord. Drug Targets*. 2011. V. 11. P. 475–503.
15. Bedard J., May S., Lis M., Tryphonas L., Drach J., Huffman J., Sidwell R., Chan L., Bowlin T., Rando R. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 1999. V. 43. P. 557–567.
16. Smith I.L., Taskintuna I., Rahhal F.M., Powell H.C., Ai E., Mueller A.J., Spector S.A., Freeman W.R. // *Arch. Ophthalmol*. 1998. V. 116. P. 178–185.
17. Limaye A.P., Corey L., Koelle D.M., Davis C.L., Boeckh M. // *Lancet*. 2000. V. 356. P. 645–649.
18. Weinberg A., Jabs D.A., Chou S., Martin B.K., Lurain N.S., Forman M.S., Crumpacker C. // *J. Infect. Dis*. 2003. V. 187. P. 777–784.
19. Gerna G., Lilleri D., Baldanti F. // *Expert Opin. Pharmacother*. 2019. V. 20. P. 1429–1438.
20. Piret J., Boivin G. // *Antiviral Res*. 2019. V. 163. P. 91–105.
21. Babkov D.A., Khandazhinskaya A.L., Chizhov A.O., Andrei G., Snoeck R., Seley-Radtke K.L., Novikov M.S. // *Bioorg. Med. Chem*. 2015. V. 23. P. 7035–7044.
22. Magri A., Ozerov A.A., Tunitskaya V., Valuev-Elliston V.T., Wahid A., Pirisi M., Simmonds P., Ivanov A.V., Novikov M.S., Patel A.H. // *Sci. Report*. 2016. V. 6. P. 29487.
23. Paramonova M.P., Ozerov A.A., Chizhov A.O., Snoeck R., Andrei G., Khandazhinskaya A.L., Novikov M.S. // *Mendeleeev Commun*. 2019. V. 29. P. 638–639.
24. Liu G., Liu C.P., Ji C.N., Sun L., Liu X.G., Wen Q.W., Xu S.G. // *Asian J. Chem*. 2013. V. 25. P. 9853–9856.
25. Novikov M.S., Babkov D.A., Paramonova M.P., Khandazhinskaya A.L., Ozerov A.A., Chizhov A.O., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., Seley-Radtke K.L. // *Bioorg. Med. Chem*. 2013. V. 21. P. 4151–4157.

UDK 577.152.1

Identification of a Novel Substrate-Derived Spermine Oxidase Inhibitor

T. T. Dunston¹, M. A. Khomutov², S. B. Gabelli^{1,3,4}, T. M. Stewart¹, J. R. Foley¹, S. N. Kochetkov², A. R. Khomutov^{2*}, R. A. Casero Jr.^{1*}

¹Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21287 USA

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

³Department of Medicine, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

⁴Department of Oncology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21287, USA

*E-mail: alexkhom@list.ru, rcasero@jhmi.edu

Received May 08, 2020; in final form, July 07, 2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10992

ABSTRACT Homeostasis of the biogenic polyamines spermine (Spm) and spermidine (Spd), present in μM -mM concentrations in all eukaryotic cells, is precisely regulated by coordinated activities of the enzymes of polyamine synthesis, degradation, and transport, in order to sustain normal cell growth and viability. Spermine oxidase (SMOX) is the key and most recently discovered enzyme of polyamine metabolism that plays an essential role in regulating polyamine homeostasis by catalyzing the back-conversion of Spm to Spd. The development of many types of epithelial cancer is associated with inflammation, and disease-related inflammatory stimuli induce SMOX. MDL72527 is widely used *in vitro* and *in vivo* as an irreversible inhibitor of SMOX, but it is also potent towards *N*¹-acetylpolyamine oxidase. Although SMOX has high substrate specificity, Spm analogues have not been systematically studied as enzyme inhibitors. Here we demonstrate that 1,12-diamino-2,11-bis(methylidene)-4,9-diazadodecane (2,11-Met₂-Spm) has, under standard assay conditions, an IC₅₀ value of 169 μM towards SMOX and is an interesting instrument and lead compound for studying polyamine catabolism.

KEYWORDS Spermine oxidase, inhibitors, MDL72527, spermine analogues, 2,11-Met₂-Spm.

ABBREVIATIONS Spm – spermine; Spd – spermidine; SMOX – spermine oxidase; PAOX – *N*¹-acetylpolyamine oxidase; MDL72527 – {*N*¹,*N*⁴-(bis(2,3-butadienyl)-1,4-butanediamine)}; 2,11-Met₂-Spm – 1,12-diamino-2,11-bis(methylidene)-4,9-diazadodecane; 2,11-Me₂Spm – 1,12-diamino-2,11-dimethyl-4,9-diazadodecane.

INTRODUCTION

The biogenic polyamines spermine (Spm) and spermidine (Spd), and their diamine precursor putrescine (Put), are organic polycations present in all eukaryotic cells in μM -mM concentrations that *a priori* determine the diversity of their functions, many of which are vitally important [1, 2]. Polyamine intracellular levels are strictly controlled by precise regulation of the activity, biosynthesis and degradation of key enzymes of their metabolism. Polyamines are tightly involved in these regulatory processes, and the cell spends considerable energy to maintain polyamine homeostasis [3]. Disturbances of polyamine metabolism and homeostasis are associated with many diseases [1–6], but they may be most essential to cancer cells, which can have

elevated requirements for polyamines. Compounds capable of specifically decreasing the polyamine pool have potential as anticancer drugs [5] and for chemoprevention [6].

FAD-dependent spermine oxidase (SMOX, Fig. 1) converts Spm to Spd with the formation of hydrogen peroxide, a source of ROS, and 3-aminopropanal, which can spontaneously form highly toxic acrolein (Fig. 1). SMOX has been demonstrated to contribute to cancer, including prostate, colon and gastric cancer induced by infection and inflammation [7–9]. In gastric cancer, *Helicobacter pylori* infection induces SMOX in gastric epithelial cells that results in the generation of hydrogen peroxide and acrolein-producing 3-aminopropanal; these lead to DNA damage and apoptosis [10].

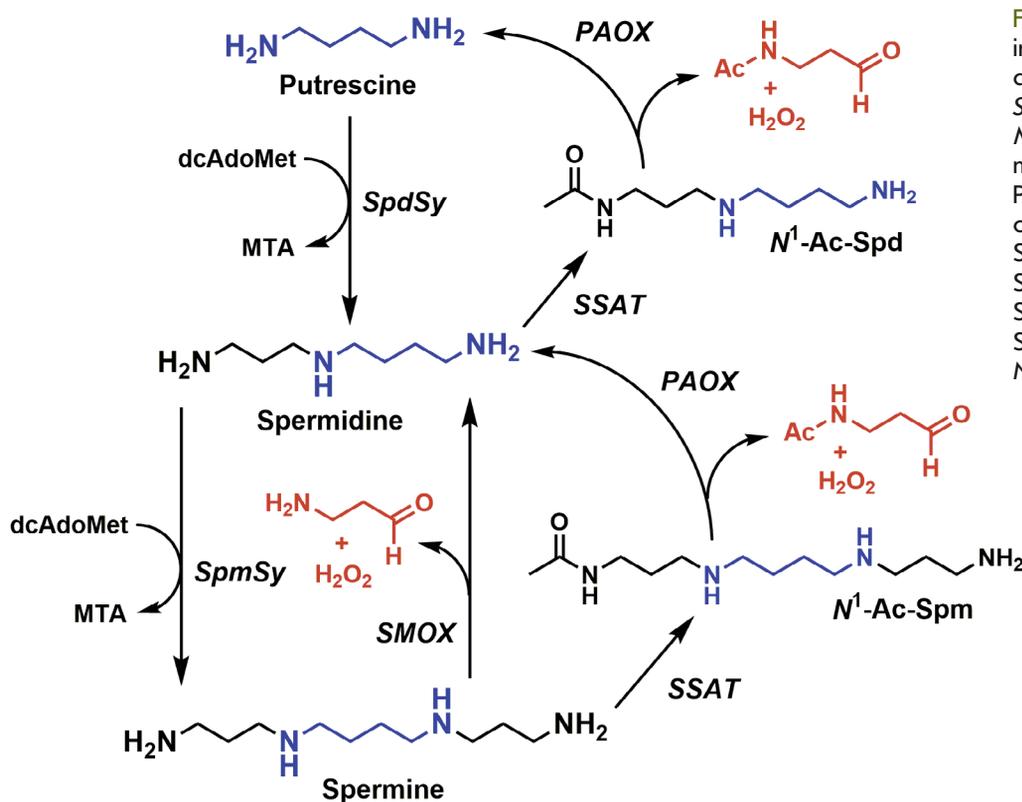


Fig. 1. Polyamine interconversions. dcAdoMet – decarboxylated S-adenosylmethionine; MTA – 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine; PAOX – N¹-acetyl polyamine oxidase; SMOX – spermine oxidase; SpdSy – spermidine synthase; SpmSy – spermine synthase; SSAT – spermidine/spermine-N¹-acetyltransferase

Inhibition of SMOX with the N¹-acetyl polyamine oxidase (PAOX, Fig. 1) irreversible inhibitor MDL72527 {N¹,N⁴-(bis(2,3-butadienyl)-1,4-butanediamine)} [11], which has an IC₅₀ value of 90 μM towards SMOX, reduces these effects [8, 9]. However, in some cases it is necessary to discriminate the individual impact of SMOX and PAOX in an integral biological effect or development of the disease and MDL72527, which has been successfully and widely used for decades, inhibits both enzymes. Specific, effective and irreversible inhibitors of SMOX are lacking, partly because the X-ray structure of the enzyme is not available. The analysis of structure/activity relationships of polyamine analogues for PAOX and SMOX has indicated that both enzymes recognize two positively charged amino groups and have hydrophobic pocket(s) located close to the substrate binding site [12]. Therefore, a number of N-substituted diamines were investigated as potential inhibitors of SMOX. However, the problem of specific inhibition of each enzyme has still not been completely solved.

C9-4 (N¹-nonyl-1,4-diaminobutane) is a Put derivative, having an IC₅₀ value of 2.6 μM towards PAOX and an IC₅₀ value of 88 μM towards SMOX. This compound reduced the volume of brain infarction in a mouse model more effectively than MDL72527 [13]. The nor-Spd derivative SI-4650 (N-(3-{[3-(dimethylamino)

propyl]amino}propyl)-8-quinolinecarboxamide) has an IC₅₀ value of 380 μM towards SMOX and an IC₅₀ value of 35 μM towards PAOX. SI-4650 inhibited cell growth, induced apoptosis, and promoted autophagy, making it a compound of interest for cancer treatment [12]. Recently, among a family of N-substituted 3,5-diamino-1,2,4-triazoles, an efficient and specific inhibitor of SMOX, N⁵-(2-([1,1'-biphenyl]-4-yloxy)benzyl)-1H-1,2,4-triazole-3,5-diamine, was identified as having an IC₅₀ value of 25 μM (the compound had an IC₅₀ value of >200 μM towards PAOX); this compound efficiently inhibited SMOX in cell culture [14]. Currently, this is the one compound that is significantly more effective towards SMOX than PAOX. Moreover, this N-substituted 3,5-diamino-1,2,4-triazole is 3.5-fold more potent against SMOX *in vitro* if compared with MDL72527 and is a promising tool to study the effects of specific SMOX inhibition on polyamine metabolism [14].

Properly designed Spm derivatives/analogues have never been widely studied as specific inhibitors of SMOX. However, taking into consideration that Spm is a substrate of SMOX and not a substrate of PAOX, one may expect that Spm derivatives may be a useful source of specific SMOX inhibitors. In the present paper, we started such investigations using 2,11-Met₂-Spm (Fig. 2A) for the inhibition of SMOX.

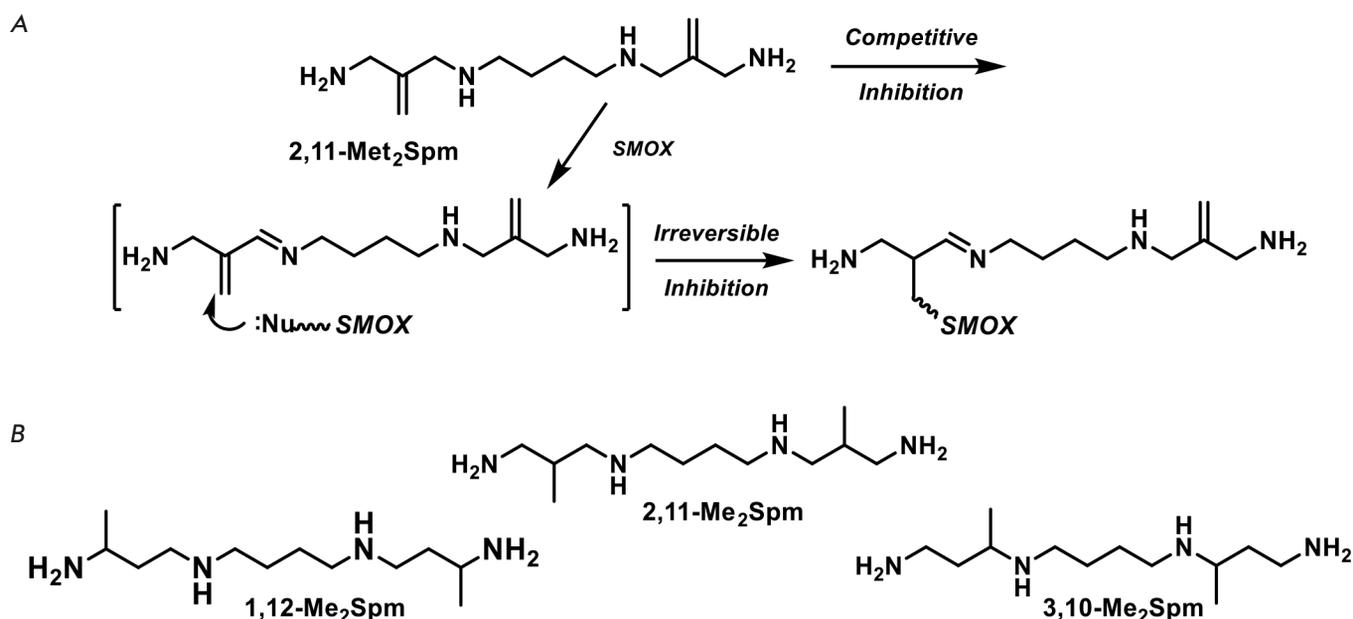


Fig. 2. (A) Possible mechanism of SMOX inhibition with 2,11-Met₂-Spm. (B) Structures of bis-methylated Spm analogues: 1,12-Me₂-Spm, 2,11-Me₂-Spm and 3,10-Me₂-Spm

EXPERIMENTAL

Materials

1,12-Diamino-2,11-bis(methylidene)-4,9-diazadodecane tetrahydrochloride (2,11-Met₂-Spm) was synthesized essentially as described in [15] starting from 2-chloromethyl-3-chloropropene-1 (Aldrich), which was reacted with potassium phthalimide to give 1-phthalimido-2-methylidene-3-chloropropane, which was used to alkylate bis-*N*¹,*N*⁴-2-nitrophenylsulfonyl-1,4-diaminobutane. Subsequent removal of protecting groups resulted in 2,11-Met₂-Spm in a good overall yield.

Protein expression and purification

The bacterial expression vector pET15b carrying the gene coding for the human SMOX protein was used to transform and express SMOX in *E. coli* BL21(DE3) competent cells using Luria Broth (LB) media supplemented with carbenicillin (100 µg/mL), 20 mg/L riboflavin and induced with 0.1 mM IPTG overnight at 18°C. The cells were lysed in a buffer containing 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10% glycerol, and 1% Triton X-100. Flavin adenine dinucleotide (FAD) was added at 250 µM with protease inhibitor (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and 7 µL β-mercaptoethanol per 10 mL lysis buffer. The lysate was centrifuged at 12,000 rpm for 30 min at 4°C, and the supernatant was applied to a Ni-NTA column. The column was pre-equilibrated with lysis buffer, and the protein was eluted in a gradient in buf-

fer containing 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 8.0), 150 mM NaCl, and imidazole ranging from 50 to 250 mM. To remove the polyhistidine tag, the protein was subjected to thrombin cleavage (25 U) and dialyzed with 10K MWCO snakeskin into buffer containing 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 50 mM NaCl (with BME) overnight at 4°C. The resulting protein solution was then subjected to Source15Q anion exchange to remove impurities.

SMOX activity assay and enzyme inhibition studies

SMOX activity was measured using a chemiluminescent enzyme-based assay detecting the formation of H₂O₂ in the presence of Spm as the substrate, as described earlier [16]. To measure the activity of 2,11-Met₂-Spm against SMOX, the enzyme (300 ng) in 0.083 M glycine buffer (pH 8.0) and the inhibitor (0–250 µM) were added to the luminol-HRP master mix and incubated at 37°C for 2 min. Spm was then added to the reaction mixture at a final concentration of 250 µM, vortexed for 3 s, and chemiluminescence was integrated over 40 s. Data were averaged and normalized to the blank reaction (no inhibitor) as % SMOX activity. Inactivated SMOX served as a negative control and was accounted for in the calculations.

RESULTS AND DISCUSSION

Design of a SMOX inhibitor of Spm origin

There is a set of different strategies to design suicide inhibitors of the enzymes of amino acid metabolism.

One strategy consists in using a substrate/product analogue with a properly positioned activated double bond(s); for example, the allene group in MDL72527, which obeys irreversible inhibition [10]. An activated double bond may be generated at one of the steps of the substrate-like transformation of the inhibitor, like in the case of pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-dependent ornithine decarboxylase and its suicide inhibitor DFMO [17]. The subsequent addition of a nucleophile to the activated double bond results in irreversible inhibition, which is developed in time. A double bond may already exist in the structure of the amino acid analogue and become activated as a result of the interaction with the coenzyme, similar to the mechanisms involved with the interaction between α -vinylic amino acids and PLP-dependent enzymes [18]. Here, these considerations were transformed into 1,12-diamino-2,11-bis(methylidene)-4,9-diazadodecane tetrahydrochloride (2,11-Met₂-Spm) having a double bond in the beta position to the splitting C-N bond (Fig. 2A). The methylidene group may be activated as a result of the substrate-like transformation of 2,11-Met₂-Spm, leading to the formation of the intermediate Schiff base (Fig. 2A). The possibility of substrate-like transformations of 2,11-Met₂-Spm is evidenced by the known dependence of the substrate properties of bis-methylated Spm analogues in the SMOX reaction on the position of the methyl groups in the analogue structure. The ability of racemic 1,12-Me₂Spm, 2,11-Me₂Spm and 3,10-Me₂Spm (Fig. 2B) to serve as substrates for SMOX decreased as the methyl group was positioned closer to the secondary (N4) amino group, and for 3,10-Me₂Spm, kinetic parameters were impossible to determine [19]. This is likely because the methyl group at the third position of the Spm backbone may restrict the proton splitting at the C3 carbon atom and influence the formation of the Schiff base, a key intermediate of the SMOX reaction.

Enzyme inhibition studies

The experiments on the inhibition of SMOX with 2,11-Met₂-Spm were performed under standard assay conditions, preincubating the enzyme with the inhibitor for 2 min and starting the reaction with the addition of Spm: with 250 μ M of 2,11-Met₂-Spm added, the enzyme was inhibited by 72% (Fig. 3). If the inhibition is competitive, the affinity of 2,11-Met₂-Spm towards SMOX must be greater than that of Spm (Spm concentration in the substrate mixture was also 250 μ M, i.e. 14 K_m). High affinity of 2,11-Met₂-Spm for SMOX seems unlikely due to the high substrate specificity of the enzyme. Among twenty-nine closely related Spm analogues of tetra- and pentaamine nature, the best substrate was pentaamine 3433 (1,16-diami-

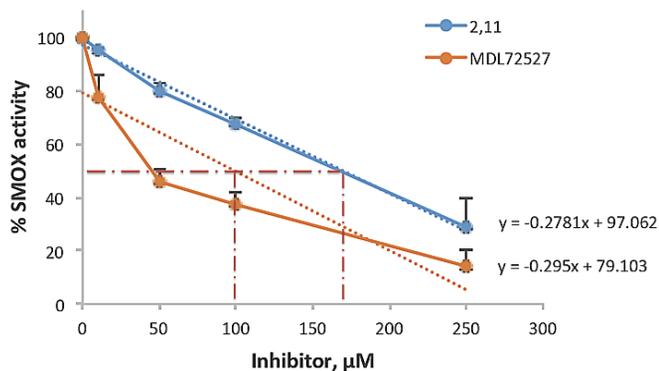


Fig. 3. Inhibition of SMOX with 2,11-Met₂-Spm (blue line) and MDL72527 (yellow line) as a positive control. Conditions: HRP-luminol (1 ng) in glycine buffer pH 8.0, enzyme and inhibitor (0–250 μ M) were incubated at 37°C for 2 min. Spm was then added at a final concentration of 250 μ M, and luminescence was integrated for 40 s. 2,11-Met₂-Spm and MDL72527 have IC₅₀ values of 169 and 100 μ M, respectively. Unlike 2,11-Met₂-Spm, the inhibition of purified SMOX by MDL72527 does not conform well to a linear transformation but it correlates well with the published IC₅₀ value of 90 μ M [14]. The R-squared values for 2,11-Met₂-Spm and MDL72527 are 0.992 and 0.7821, respectively. Data were expressed from three independent experiments with standard deviations (SD)

no-4,8,13-triazahexadecane), with K_m of 1.3 μ M, i.e. 14 times better than Spm; among the rest, only pentaamine 3434 (1,17-diamino-4,9,13-triazaheptadecane) was as efficient as Spm [20]. However, if the inhibition of SMOX is irreversible, the affinity of the inhibitor towards the enzyme at the reversible stage may be poor, being consistent with the results observed when SMOX was preincubated with 2,11-Met₂-Spm at 100 μ M and the enzyme activity was inhibited only by 33% (Fig. 3). It is currently unclear how quickly inhibition develops in time and the 2 min preincubation time, typical for MDL72527, may be too short for 2,11-Met₂-Spm and SMOX because of the steric effect of the methylidene group in the β -position to the splitting C-N bond.

The activity of 2,11-Met₂-Spm towards SMOX (IC₅₀ = 169 μ M) was worse than that reported for MDL72527 (IC₅₀ = 90 μ M [14]), which is an irreversible PAOX inhibitor of a Put nature with reactive allene substituents. As a Spm derivative, it is likely that 2,11-Met₂-Spm will be less inhibitory of PAOX (natural substrates are N¹-Ac-Spd and less effective N¹-Ac-Spm) compared with SMOX. This is likely based on the comparison of the activity of the structurally similar *rac*-2,11-Me₂Spm (Fig. 2B) towards SMOX and PAOX. *Rac*-2,11-Me₂Spm was a comparatively poor substrate of SMOX, having a V_{max} of 124 pmol/min/ μ g protein and a K_m of 121 μ M, while the activity of PAOX

was inhibited for 60% only at the 500 μM concentration, when a fixed 50 μM concentration of the substrate N^1 -Ac-Spd was used in the PAOX assay [19].

Our results clearly show that it is possible to design a Spm analogue that inhibits the FAD-dependent SMOX, a key enzyme of polyamine catabolism. 2,11-Met₂-Spm has an IC₅₀ value of 166 μM towards SMOX. Although the precise mechanism of the inhibition, the specificity of 2,11-Met₂-Spm action, and the activity in cell culture are under investigation, the development of a selective inhibitor remains critical, not only as an experimental tool, but also as a potential therapeutic agent as SMOX is known to play a critical role in the development of multiple diseases, including cancer [5, 7, 8, 10].

FUNDING AND ACKNOWLEDGMENTS

Synthesis of the inhibitor was supported by the Russian Science Foundation grant 17-74-20049 (AMK and ARK). Inhibition studies were supported by the National Institutes of Health grants NCI R01CA204234 and RO1CA235863 (RAC). This work was supported by a research grant from the University of Pennsylvania Orphan Disease Center in partnership with the Snyder-Robinson Foundation MDBR-20-135-SRS (RAC, TMS). We would like to thank Dr. Michelle S. Miller and Puchong Thirawatananond for their help in designing the purification protocol of SMOX. ●

REFERENCES

1. Miller-Fleming L., Olin-Sandoval V., Campbell K., Ralser M. // *J. Mol. Biol.* 2015. V. 427. P. 3389–3406.
2. Pegg A.E. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 14904–14912.
3. Michael A.J. // *Biochem. J.* 2016. V. 473. P. 2315–2329.
4. Ramani D., De Bandt J.P., Cynober L. // *Clin. Nut.* 2014. V. 33. P. 14–22.
5. Casero R.A., Murray Stewart T., Pegg A.E. // *Nature Rev. Cancer* 2018. V. 18. P. 681–695.
6. Gerner E.W., Bruckheimer E., Cohen A. // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. P. 18770–18778.
7. Goodwin A., Jadallah S., Toubaji A., Lecksell K., Hicks J.L., Kowalski J., Bova G.S., De Marzo A.M., Netto G.J., Casero R.A. // *Prostate.* 2008. V. 68. P. 766–772.
8. Chaturved R., Asim M., Romero-Gallo J., Barry D.P., Hoge S., Sablet T., Delgado A.G., Wroblewski L.E., Piazuelo M.B., Yan F., et al. // *Gastroenterology.* 2011. V. 141. P. 1696–1708.
9. Goodwin A.C., Shields C.D., Wu S., Huso D.L., Wu X., Murray Stewart T., Rabizadeh S., Woster P.M., Sears C.L., Casero R.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 15354–15359.
10. Sierra J.C., Piazuelo M.B., Luis P.B., Barry D.P., Allaman M.M., Asim M., Sebrell T.A., Finley J.L., Rose K.L., Hill S. et al. // *Oncogene.* 2020. V. 39. P. 4465–4474.
11. Bey P., Bolkenius F.N., Seiler N., Casara P. // *J. Med. Chem.* 1985. V. 28. P. 1–2.
12. Sun L., Yang J., Qin Y., Wang Y., Wu H., Zhou Y., Cao C. // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2019. V. 34. P. 1140–1151.
13. Masuko T., Takao K., Samejima K., Shirahata A., Igarashi K., Casero Jr. R.A., Kizawaa Y., Sugita Y. // *Neurosci. Lett.* 2018. V. 672. P. 118–122.
14. Holshouser S., Dunworth M., Murray Stewart T., Peterson Y.K., Burger P., Kirkpatrick J., Chen H.-H., Casero Jr. R.A., Woster P.M. // *Med. Chem. Commun.* 2019. V. 10. P. 778–790.
15. Grigorenko N.A., Khomutov M.A., Simonian A.R., Kochetkov S.N., Khomutov A.R. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2016. V. 42. P. 423–427.
16. Goodwin A.C., Murray Stewart T.R., Casero Jr. R.A. // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 720. P. 173–181.
17. Metcalf B.W., Bey P., Danzin C., Jung M.J., Casara P., Vevret J.P. // *J. Am. Chem. Soc.* 1978. V. 100. P. 2551–2553.
18. Berkowitz D.B., Charette B.D., Karukurichi K.R., McFadden J.M. // *Tetrahedron Asym.* 2006. V. 17. P. 869–882.
19. Khomutov M., Hyvönen M.T., Simonian A., Formanovsky A.A., Mikhura I.V., Chizhov A.O., Kochetkov S.N., Alhonen L., Vepsäläinen J., Keinänen T.A., Khomutov A.R. // *J. Med. Chem.* 2019. V. 62. P. 11335–11347.
20. Takao K., Shivahata A., Samejima K., Casero R.A., Igarashi K., Sugita Y. // *Biol. Pharm. Bull.* 2013. V. 36. P. 407–411.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается на русском и английском языках. Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, РИНЦ.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редколлегией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков с пробелами (примерно 30 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков с пробелами (примерно 15 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10.

Новые приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в разделе «Краткие сообщения». Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (5–6 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись и все необходимые файлы следует загрузить на сайт www.actanaturae.ru:

- 1) текст в формате Word 2003 for Windows;
- 2) рисунки в формате TIFF;
- 3) текст статьи с рисунками в едином pdf-файле;
- 4) перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, подписей к рисункам, русскоязычных ссылок;
- 5) сопроводительное письмо, в котором надо указать, что представленный материал ранее нигде не был опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях;
- 6) лицензионный договор (форму договора можно скачать с сайта www.actanaturae.ru).

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт – курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт – полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).

- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректурой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком *.
- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3–6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{пл}$ – температура плавления, $T_{ф.п}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.

- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μM ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «·» обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК·РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (А, Т, G, С, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (АТФ, АМФ и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (Т34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой ре-

дакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с ответами на все замечания рецензента.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте в порядке их цитирования, нумеруются и приводятся в квадратных скобках. Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Для книг: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

Для связи с редакцией следует использовать следующий электронный адрес: actanaturae@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.

Acta Naturae

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

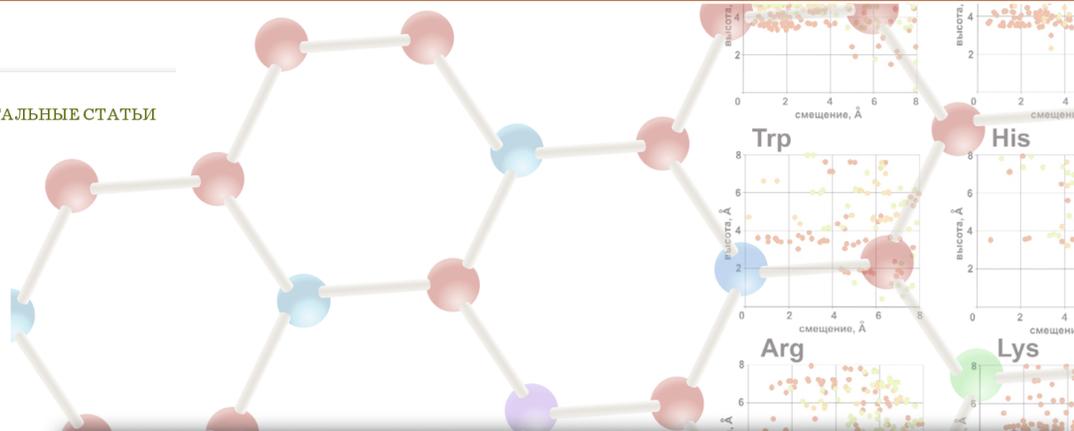
Флуоресценция клеток после окрашивания различными белками. Приведены средние значения трех экспериментов ± ошибка среднего

Образец	Интенсивность флуоресценции в канале FL1	
	Клетки SK-BR-3	Клетки CHO
Неокрашенные клетки	3700 ± 400	3700 ± 900
+ β-LG-FITC	5700 ± 600	3300 ± 400
+ 4D5scFv-FITC	$2.7 \times 10^4 \pm 7 \times 10^3$	3200 ± 500
+ 4D5scFv-miniSOG	$2.3 \times 10^4 \pm 3 \times 10^3$	4600 ± 400
+ DARPIn-miniSOG	$1.71 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^3$	3000 ± 400

Наличие на поверхности клеток рецептора HER2/neu было подтверждено их окрашиванием 4D5scFv, конъюгированным с флуоресцентноантибиотиком (4D5scFv-FITC). В качестве отрицательного контроля использовали бета-лактоглобулин, конъюгированный с FITC (β-LG-FITC), не связывающийся с HER2 на поверхности клеток. Показано, что HER2-отрицательные клетки CHO не дают флуоресцентного сигнала после инкубации с белками 4D5scFv-FITC, β-LG-FITC и целевыми белками 4D5scFv-miniSOG, DARPIn-miniSOG (таблица).

Таким образом, показано, что адресные рекомбинантные белки 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG высокоспецифично связываются с поверхностным рецептором HER2/neu на поверхности клеток SK-BR-3 аденокарциномы молочной железы человека.

Обнаружено, что после связывания белков DARPIn-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG с рецептором на поверхности клеток SK-BR-3 при температуре +4°C рецептор-опосредованной интернализации белков не происходит. Однако при +37°C комплекс рецептор-белок подвергается интернализации, о чем свидетельствует снижение интенсивности флуоресценции ΔMFI (разность между средними значениями флуоресценции окрашенных и неокрашенных клеток) (рис. 1). При этом рекомбинантный белок DARPIn-miniSOG интернализуется в комплексе с рецептором быстрее, чем 4D5scFv-miniSOG, так как ΔMFI для DARPIn-miniSOG снижается вдвое по сравнению с начальной точкой в течение первых 10 мин, в то время как для 4D5scFv-miniSOG это занимает 40 мин. Полученные данные согласуются с опубликованными: 4D5scFv-miniSOG проявляет более высокую цитотоксичность по сравнению с DARPIn-miniSOG [5, 6], так как дольше локализован на мембране. Поскольку преимущественным механизмом гибели клеток, облученных в присутствии данных фототоксинов, является некроз, по-

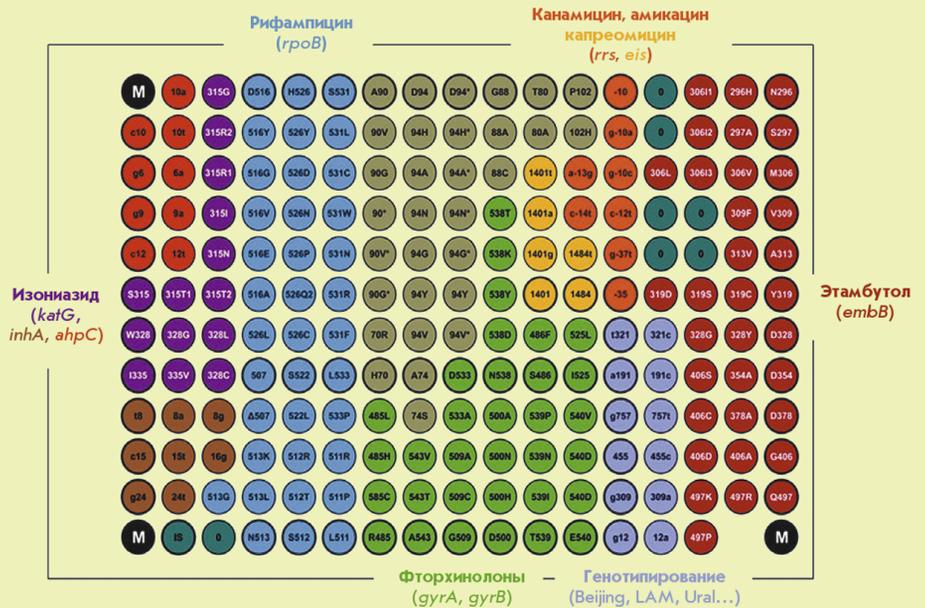


ОКТАБРЬ-ДЕКАБРЬ 2018 ТОМ 10 № 4 (39)

ISSN 2075-8243

Acta Naturae

Технология гидрогелевых биочипов ИМБ РАН: 30 лет спустя



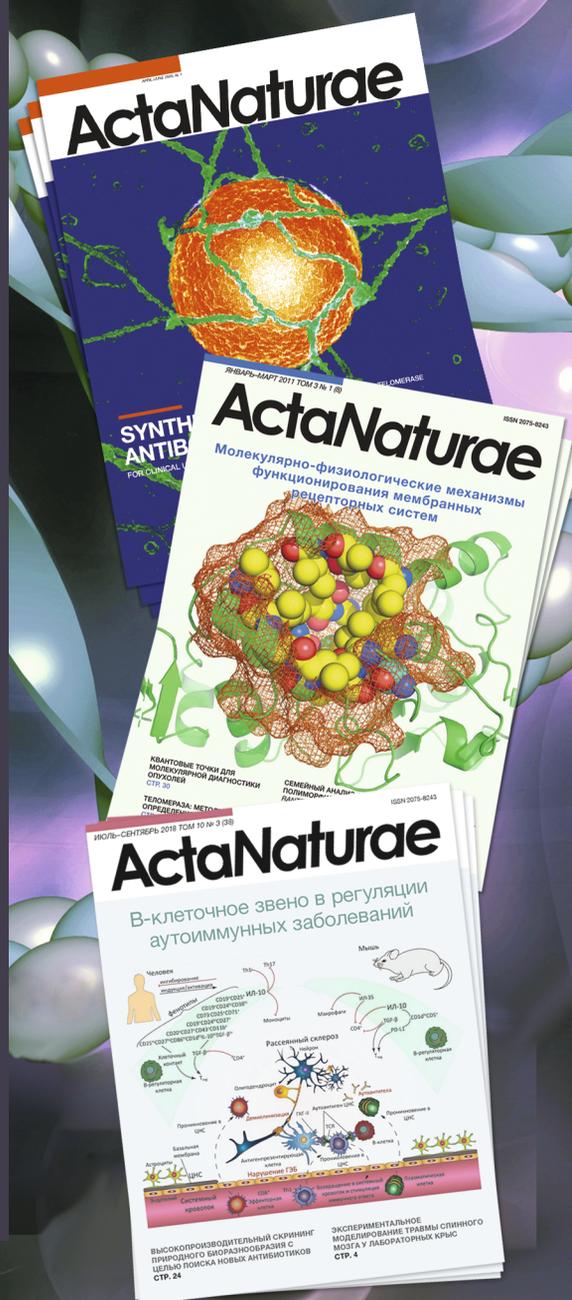
БЕЛОК CG9890 С ДОМЕНАМИ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ – НОВЫЙ КОМПОНЕНТ ENY2-СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСОВ ДРОЗОФИЛЫ
СТР. 110

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С БЕЛКОМ AIF
СТР. 100

ActaNaturae

Журнал *Acta Naturae* уделяет особое внимание междисциплинарному характеру исследований и разработок, которые находятся на стыке различных сфер биологических специальностей – молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетики и биологической медицины.

Журнал *Acta Naturae* выпускается на русском и английском языках, входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных РИНЦ, PubMed, Web of Science, Scopus.



ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ:

Если Вы хотите опубликовать свою работу в журнале *Acta Naturae*, пишите на actanaturae@gmail.com и звоните по телефону: 8 (495) 727-38-60

